

SÉRIE A, N° 2979

N° D'ORDRE :

3851

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

BERTHE SALZGEBER

1^{re} THÈSE. — INFLUENCE DE FACTEURS TÉRATOGENES SUR L'ÉVOLUTION DES
ORGANES SEXUÉS DE L'EMBRYON DE POULET.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 17 janvier 1957 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN *Président.*

MAY } *Examineurs.*

DEVILLERS }

WOLFF (*Invité*).

PARIS

Editions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1958

SÉRIE A, N° 2979
N° D'ORDRE :
3851

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

BERTHE SALZGEBER

1^{re} THÈSE. — INFLUENCE DE FACTEURS TÉRATOGENES SUR L'ÉVOLUTION DES
ORGANES SEXUÉS DE L'EMBRYON DE POULET.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 17 janvier 1957 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN	Président.
MAY	} Examinateurs
DEVILLERS	
WOLFF (Invité).	



PARIS

Editions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1958

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	AUDUBERT	T	Électrochimie.
E. DARMOIS.....	T	Enseignement de Physique.	L'HÉRITIER	T	Génétique.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	GRIVET	T	Radioélectricité.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale	PONCIN	T	Mécanique des fluides.
DE BROGLIE.....	T	Théories physiques.	THIERY	T	Mécanique appliquée.
JOB	T	Chimie générale.	DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	QUELET	T	Chimie organique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
M. CURIE.....	T	Physique (P.C.B.).	JUNG	T	Pétrographie.
BARBRÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
G. DARMOIS.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	WIEMANN	T	Chimie organ. structurale.
Jacques BOURCART.	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste.
PLANTFOL	T	Botanique.	VASSY		Physique de l'atmosphère
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.	DESTOUCHES		Théories physiques.
L'ÉVOST	T	Chimie organique.	M. PRUVOST.....	T	Géologie.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	HOCART	T	Minéralogie.
WYART	T	Minéralogie.	J.-P. MATHIEU..	T	Physique (P.C.B.).
TEISSIER	T	Zoologie.	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).
MANGENOT	T	Biologie végétale.	MAY	T	Biologie animale (P.C.B.).
P. AUGER.	T	Physique quantique et relativité.	CROQUET	T	Calcul différentiel et intégral.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.	FELDMANN		Biologie (P.C.B.).
LIVETEAU	T	Géologie.	GUINIER	T	Physique (P.C.B.).
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	JOST	T	Biologie (P.C.B.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	FORTET	T	Calcul des probabilités.
LAFITTE	T	Chimie générale.	SCHWARTZ	T	Méthode mathémat. de la Physique.
FAYARD	T	Mécanique générale.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
COULOMB	T	Physique du Globe.	VALAYARD	T	Aviation.
M ^{lle} COUSIN.....	T	Biologie animale (P.C.B.).	BRELOT	T	Calcul différentiel.
CRÉTIEN	T	Chimie minérale.	NORMANT	T	Chimie (P.C.B.).
P. DRACH	T	Zoologie.	BÉNARD	T	Chimie (P.C.B.).
KASTLER	T	Physique.	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
ÉPHRUSSI	T	Génétique.	DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.	GELOSO		Chimie (S.P.C.N.).
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.).	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
GAUTHIERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).	ULRICH	T	Physiologie végétale.
LUCAS	T	Recherches physiques.	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
ARNULF	T	Optique appliquée.	CHADEFAUD		Botanique.
MAX MORAND.....	T	Physique.	DESTRIAU		Physique (M.P.C.).
SOLEILLET	T	Physique.	M ^{lle} LE BRETON..		Physiologie générale.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.	SALEM		Mathématiques générales.
DANJON	T	Astronomie.	LFLONG	T	Mathématiques générales
FROMAGEOT	T	Chimie biologique.	DEVILLERS		Anatomie et Histologie comparées.
LAPORTE	T	Physique générale et Radio-activité.	EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	FRANÇON		Physique (M.P.C.).
PETIT	T	Biologie maritime.	GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
GALLIEN	T	Embryologie.	PISOT	T	Calcul des probabilités.
EICHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.).	E. ROCH		Géologie.
DE COGNAC.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).	SCHATZMANN		Astrophysique.
M ^{lle} CAUCHOIS.....	T	Chimie physique.	TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
THELLIER	T	Physique du Globe.	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
			JOLIOT	T	Physique nucléaire et Radioactivité.

Secrétaire Général CH. MONIER.

A MES PARENTS

A MON MAITRE

M. LE PROFESSEUR WOLFF



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INFLUENCE DE FACTEURS TÉRATOGENES
SUR L'ÉVOLUTION DES ORGANES SEXUÉS
DE L'EMBRYON DE POULET

I. — ACTION DE FACTEURS PHYSIQUES

II. — ACTION DE FACTEURS CHIMIQUES

(Avec 10 figures et 7 planches)

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	355
PREMIÈRE PARTIE. — ACTION DE FACTEURS PHYSIQUES	
CHAPITRE PREMIER. — HISTORIQUE	358
CHAPITRE II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES	360
A. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES	360
1. — Irradiation aux rayons X	361
a) Irradiation <i>in toto</i>	361
b) Irradiation localisée.	361
c) Irradiation en culture	363
2. — Élévation de la température de la couveuse	363
B. — TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	364
CHAPITRE III. — ACTION DES RAYONS X.	364
A. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	364
1. — Irradiation <i>in toto</i>	364
2. — Irradiation localisée des embryons	365
3. — Emploi combiné des irradiations totales et localisées	366
4. — Irradiation des organes explantés <i>in vitro</i>	367
5. — Conclusions	368
B. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES DES GLANDES GÉNITALES NORMALES	368
1. — Évolution de l'appareil génital mâle.	369
2. — Évolution de l'appareil génital femelle.	370
3. — Caractères des éléments germinaux	370
4. — Différenciation sexuelle des gonades en culture	370

	Pages
C. — STÉRILISATION DES EMBRYONS DE POULET.	371
1. — Résultats	371
2. — Structure histologique des gonades stériles	371
a) Aspect de l'ovaire stérile	371
b) Étude du testicule stérile	372
3. — Conclusions	372
D. — ÉTUDE DES EMBRYONS INTERSEXUÉS.	373
1. — Résultats	373
2. — Procès-verbal des expériences d'irradiation (Embryons mâles).	374
3. — Caractères morphologiques des glandes et des conduits génitaux des intersexués.	376
4. — Caractères histologiques des glandes génitales des intersexués.	377
5. — Étude des embryons de canard intersexués	379
6. — Comparaison des résultats avec les intersexués obtenus par d'autres méthodes	381
E. — ÉVOLUTION DES CANAUX DE MÜLLER CHEZ DES MALES NON INTERSEXUÉS.	382
F. — ÉTUDE DE L'ACTION DES RAYONS X SUR LES GONADES EXPLANTÉES <i>in vitro</i>	383
CHAPITRE IV. — ACTION D'UNE TEMPÉRATURE ÉLEVÉE SUR LES ORGANES SEXUÉS.	384
A. — ACTION SUR LES CONDUITS GÉNITAUX	384
B. — ACTION SUR LES GONADES CULTIVÉES <i>in vitro</i>	385
CHAPITRE V. — CONCLUSIONS	387
DEUXIÈME PARTIE. — ACTION DE FACTEURS CHIMIQUES	
CHAPITRE PREMIER. — HISTORIQUE	392
CHAPITRE II. — TECHNIQUE	394
A. — INJECTION DE SUBSTANCES TOXIQUES	394
Trypaflavine, Colchicine, Narcotine	394
B. — CULTURE DE GLANDES GÉNITALES EN PRÉSENCE DE SUBSTANCES TOXIQUES.	394
1. — Substance en solution au contact de l'organe	395
2. — Substance ajoutée au milieu de culture	395
3. — Dispositif spécial pour le passage des gaz.	395
C. — CLASSIFICATION SOMMAIRE DES SUBSTANCES UTILISÉES.	397
CHAPITRE III. — RESULTATS EXPÉRIMENTAUX	397
A. — DÉVELOPPEMENT DES GLANDES GÉNITALES	398
1. — Étude des glandes génitales au stade du prélèvement : 9 à 10 jours	398
2. — Évolution des organes sexués en culture	399
B. — ACTION DE SUBSTANCES TÉRATOGENÈS SUR LES GONADES EXPLANTÉES <i>in vitro</i>	400
I. — Poisons cellulaires	400
1. — Effet trypaflavine	400
2. — Effet colchicine, p. 408; action du cacodylate de sodium, p. 411; action de la narcotine, p. 414; action de l'hydroquinone, p. 416.	
3. — Effet nicotine	418

	Pages
II. — <i>Inhibitions respiratoires</i>	421
1. — Action du cyanure de potassium	421
2. — Évolution des gonades en présence d'azote	422
III. — <i>Évolution des gonades en présence d'oxygène</i>	427
C. — RÉSUMÉ DES ANOMALIES PROVOQUÉES PAR LES DIFFÉRENTES SUBSTANCES TÉRATOGENES	428
1. — Action inhibitrice sur la médullaire de l'ovaire et sur le testicule	428
2. — Action spécifique sur le cortex de l'ovaire.	428
3. — Vacuolisation des organes	428
CHAPITRE IV. — CONCLUSIONS CONCERNANT L'ACTION DES AGENTS CHIMIQUES	430
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	431
RÉSUMÉ	433
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	435

INTRODUCTION

La réalisation expérimentale de malformations a révélé la possibilité de perturber l'évolution normale d'un organisme par action de facteurs physiques et chimiques.

L'intérêt de ces recherches, ainsi que le souligne P. ANCEL (1950) dans son livre *La chimiotératogenèse chez les Vertébrés*, consiste à reproduire des malformations spontanées pour en étudier le déterminisme et, par là, créer des moyens pour éviter leur apparition.

Dans le domaine de la sexualité, de telles perturbations du développement normal ont également été réalisées par action de substances chimiques hormonales. Ainsi les recherches expérimentales d'Et. WOLFF et A. GINGLINGER (1935), de B. H. WILLIER, T. F. GALLAGHER et F. C. KOCH (1935), de V. DANTCHAKOFF (1935) effectuées chez l'embryon de poulet ont montré que des hormones sexuelles administrées à un stade précoce du développement, avant la différenciation sexuelle, pouvaient modifier de façon élective l'évolution normale de l'appareil génital. De nombreux travaux portant sur l'ensemble des vertébrés ont depuis lors confirmé ces résultats. L'obtention d'intersexués, ainsi que le fait remarquer ANCEL, « met en évidence l'action élective d'une substance chimique dans le développement normal des ébauches gonadiques ».

D'autres facteurs tératogènes non hormonaux sont-ils capables d'agir électivement sur l'appareil génital ou sur certains de ses constituants ?

On sait que les cellules germinales, constituants essentiels des gonades sont électivement sensibles à l'action de différents facteurs, et en particulier à l'irradiation aux rayons X. V. DANTCHAKOFF (1932-1933), irradiant de jeunes embryons de poulet âgés de 6 à 12 jours à l'aide des rayons X, obtient ainsi la stérilisation des glandes génitales. Les cellules germinales sont donc électivement détruites par l'action d'un facteur tératogène.

DULBECCO (1946-1948) reprenant ces expériences, soumet au rayonnement γ du radium des embryons plus jeunes et obtient des sujets qui sont à la fois stériles et de sexe femelle.

L'auteur voit dans ce résultat une action spécifique du rayonnement sur la différenciation sexuelle qui provoquerait la transformation complète des mâles en femelles. Cependant, ses résultats n'intéressent qu'un petit nombre de cas (14) et ses observations ne portent que sur des embryons de 10 jours, un stade où il est difficile de distinguer les femelles d'intersexués éventuels.

Les observations de cet auteur nous ont incitées à étudier l'action des rayons X, puis de substances chimiques, sur les glandes génitales de l'embryon de poulet. Pour effectuer une telle analyse, 3 méthodes sont possibles :

- 1) Le facteur tératogène agit sur l'embryon tout entier.
- 2) Ce facteur exerce son action sur un endroit précis, bien limité de l'organisme.
- 3) L'agent physique ou chimique agit sur un organe isolé de l'organisme, cultivé *in vitro* dans des conditions bien définies.

Le but de nos recherches est d'étudier l'action de facteurs externes sur la différenciation sexuelle et sur les différents constituants, germinaux et somatiques de l'appareil génital de l'embryon de poulet. Deux séries de recherches ont été effectuées :

1) Reprenant les expériences de DULBECCO (1947) à l'aide des rayons X, nous nous proposons d'obtenir la stérilisation et de vérifier le sexe des embryons, en les laissant évoluer jusqu'à un stade assez avancé de la différenciation sexuelle. L'irradiation précoce et intense exerce-t-elle une action sur la différenciation du sexe ?

2) Au cours d'une 2^e série de recherches, je me suis adressée à la technique des cultures d'organes *in vitro*, afin de déterminer l'action directe de facteurs extérieurs sur l'évolution et la morphologie des glandes génitales. Les expériences de cultures d'organes effectuées par Et. WOLFF et K. HAFEN (1952) ont montré que la glande génitale femelle de l'embryon de poulet explantée *in vitro* évoluait en ovotestis. La médullaire, au lieu de régresser en formant des lacunes, comme dans le cas d'un ovaire normal, conserve son noyau testiculaire. On peut penser qu'il s'agit là d'un déséquilibre hormonal : mais quel est le facteur responsable de cette évolution aberrante ? L'action de différents agents tératogènes a été éprouvée sur de telles gonades.

Exercent-ils une action spécifique sur certains constituants de la glande génitale explantée ? Agissent-ils comme des hormones en inhibant et en stimulant certains tissus ?

Cette étude, analysant l'effet de facteurs tératogènes, sur les différents constituants des organes sexués est liée au problème du mode d'action des hormones sexuelles. On sait, en effet, que les hormones peuvent exercer une action destructrice sur certains organes et constituants cellulaires ; ainsi les travaux d'Et. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG (1952) ont montré la dégénérescence par la pycnose des canaux de MÜLLER soumis à l'action d'hormones mâles. V. W. MÜLLENDORFF (1941) et H. LETTRÉ (1944, 1946) ont observé une inhibition de l'activité mitotique des cellules cultivées *in vitro*, sous l'influence d'hormones sexuelles. Ces effets, électifs et nécrosants, sont comparables à ceux d'une substance tératogène. On peut se demander si, inversement,

des facteurs physiques et chimiques variés peuvent mimer des actions hormonales et agir comme celles-ci sur certains systèmes enzymatiques.

Le problème de l'action de substances toxiques sur les organes sexués rentre dans le cadre de la chimiotératogénèse.

P. ANCEL (1950) a montré que des substances toxiques injectées à l'embryon de poulet, exercent une action spécifique sur certains organes. Existe-t-il dans ces organes un tissu électivement sensible à une substance tératogène ? La méthode des cultures d'organes nous permet d'analyser l'action d'agents variés sur un organe déterminé. La gonade embryonnaire du poulet, l'ovaire en particulier avec ses deux constituants bien distincts, cortex et médullaire, donne un bon test pour étudier cette action.

Ce travail a été effectué au laboratoire d'Embryologie Expérimentale de la Faculté des Sciences de Strasbourg et du Collège de France à Paris, sous la direction de mon Maître, M. le Professeur Etienne WOLFF.

Qu'il me soit permis de lui exprimer mes sentiments de vive reconnaissance pour les conseils éclairés et les encouragements qu'il m'a prodigués.

Son enseignement et l'intérêt constant avec lequel il a bien voulu guider et suivre mes recherches m'ont été d'un précieux secours. Je lui dois ma formation scientifique et l'orientation de ma vie vers ce domaine merveilleux qui est la recherche biologique.

Je tiens également à remercier M. le Professeur P. JOLY pour les conseils qu'il m'a prodigués avec beaucoup de bienveillance.

Je remercie vivement M. le Professeur GALLIEN qui a bien voulu accepter d'être le rapporteur de mon travail de thèse, MM. les Professeurs MAY et DEVILLERS qui me font l'honneur d'examiner mes travaux.

PREMIÈRE PARTIE

ACTION DE FACTEURS PHYSIQUES

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Les gonades embryonnaires et adultes se sont montrées électivement sensibles à l'action de divers agents extérieurs.

Parmi les facteurs physiques, les plus étudiés ont été les *radiations* (rayons X, rayons ultra-violet, rayonnement du radium) dont on a reconnu très tôt le pouvoir stérilisateur.

Chez les Oiseaux, MIRSKAIA et CREW (1931) signalent la destruction du tissu spermatogénétique sous l'influence des rayons X.

La stérilisation des gonades embryonnaires a été obtenue chez le Poulet par destruction des cellules germinales ou gonocytes dans leur lieu d'origine présumé ou dans l'ébauche gonadique. La plupart de ces travaux ont été effectués en vue de rechercher l'origine des cellules sexuelles et de démontrer l'existence d'une « lignée germinale ».

V. DANTCHAKOFF et A. LACASSAGNE (1932) obtiennent des embryons stériles en soumettant au rayonnement β du radon la zone du « croissant génital », à un stade précoce du développement, avant la migration des cellules germinales dans les ébauches gonadiques. V. DANTCHAKOFF et A. LACASSAGNE (1932), V. DANTCHAKOFF (1933) étudiant les effets des radiations sur le développement de la gonade, exposent aux rayons X des embryons âgés, au moment où l'ébauche gonadique est peuplée de cellules germinales. Ils sont irradiés le 6^e, 9^e et 12^e jour de l'incubation ; la première irradiation a lieu à un stade où la gonade se trouve encore à l'état d'indifférence sexuelle, alors que, vers le 9^e jour, elle est nettement différenciée en ovaire ou testicule. La dose totale de 900 r est administrée en 3 fois, à 3 jours d'intervalle. Les embryons autopsiés le 17^e et le 21^e jour de l'incubation ont des glandes génitales stériles. Les tissus somatiques ne sont pas altérés, les gonades sont aussi bien des ovaires que des testicules. Sur 13 embryons ainsi obtenus : 5 sont des mâles, 8 sont des femelles.

Ces expériences montrent que les radiations exercent la même action sélective sur les cellules germinales de la gonade et du croissant.

R. DULBECCO (1946) a repris ces expériences sur la stérilisation des gonades, mais il soumet les embryons de Poulet à l'action du rayonnement γ du radium à des stades précoces, avant la formation de l'ébauche gonadique. Ils sont irradiés totalement à partir du stade de la ligne primitive ou à partir du stade 5 à 8 somites. L'irradiation est prolongée pendant 24 heures jusqu'à ce que les embryons aient atteint le stade 20 à 25 somites.

La mortalité est considérable. Sur 180 embryons irradiés, 14 embryons seulement vivent au-delà du 8^e jour de l'incubation. La plupart de ces sujets fixés vers le 10^e jour, sont stériles et de sexe femelle. DULBECCO leur attribue ce sexe d'après un certain nombre de caractères :

— développement plus grand de la gonade gauche par rapport à la droite ;

- épithélium germinatif recouvrant la gonade gauche avec prolifération des cordons sexuels secondaires dépourvus de gonocytes ;
- présence d'une couche de mésenchyme entre l'épithélium et la masse centrale de la gonade.

DULBECCO se demande si ce résultat est dû à un phénomène de mortalité sélective des mâles, à une époque où la différenciation sexuelle n'est pas encore commencée ; ou bien, si cette transformation du sexe est une conséquence de l'irradiation précoce et intense appliquée durant un temps relativement long. Pour appuyer cette dernière hypothèse, il donne des doses moins élevées : 400 r administrés au stade 6 à 7 somites, pendant 16 heures.

Il obtient 11 embryons de sexe mâle et femelle. 4 ♂ sur 6 possèdent une gonade gauche un peu plus volumineuse que celle de droite. Elle présente en certains endroits un épithélium germinatif épais ; celui-ci est cependant moins développé que l'épithélium observé chez des ovaires du même stade. DULBECCO constate en outre un arrêt dans le développement des cordons sexuels primaires, qui se manifeste seulement dans la gonade gauche. Cette modification lui paraît intéressante car chez les Oiseaux, cette dernière seule évolue en un ovaire.

On pouvait cependant émettre quelques doutes sur les résultats obtenus par l'auteur :

¹⁰ Ces résultats sont fondés sur un petit nombre de cas. On ne peut parler d'une mortalité sélective des mâles, car le nombre d'embryons atteignant le stade de la différenciation sexuelle est très faible.

²⁰ L'intersexualité n'est pas démontrée. En effet, toutes ces observations portent sur des embryons âgés de 10 jours ; à ce stade la différenciation sexuelle n'est pas encore très accusée ; la présence d'un épithélium germinatif, au stade de 10 ou 11 jours, n'est pas forcément un signe de féminisation.

Nous avons, en effet, observé un petit épithélium chez des embryons, âgés de 9 ou 10 jours, non traités par les rayons X. L'irradiation précoce et intense retarde, en outre, le développement des embryons et la différenciation des organes. Il est donc difficile de distinguer, à ces stades jeunes, les individus femelles d'intersexués éventuels.

Nous avons effectué des expériences d'irradiation de glandes génitales à l'aide des rayons X (Et. WOLFF et B. SALZGEBER, 1949) en nous adressant à la technique d'irradiation localisée, mise au point par P. ANCEL et Et. WOLFF (1933). Les embryons sont irradiés entre le 2^e et le 6^e jour de l'incubation. On les laisse évoluer jusqu'aux stades 15 à 20 jours dans le cas du Poulet, 21 à 23 jours dans le cas du Canard. A ces stades, la différenciation sexuelle est nette, même chez les sujets traités par les rayons X.

Dans certaines conditions d'irradiation précisées dans ce mémoire, les rayons X provoquent la féminisation partielle des caractères sexuels mâles. La plupart des embryons, autopsiés à un stade auquel la différenciation sexuelle est nette, sont des intersexués. Chez d'autres embryons mâles, l'action du rayonnement s'exerce de préférence sur les conduits génitaux. Ainsi, les rayons X agissent de façon élective sur les éléments germinaux et perturbent l'évolution normale des gonades et du tractus müllerien.

D'autres agents physiques peuvent-ils modifier l'évolution sexuelle normale ?

Chez les Batraciens, la différenciation sexuelle est particulièrement sensible aux influences extérieures. Ainsi les conditions de température à laquelle on élève les Têtards orientent leur sexe dans le sens mâle ou femelle. Les expériences de WITSCHI (1929) portant sur *Rana temporaria* et *Rana sylvatica* montrent que la température élevée à 27° C favorise la transformation des Têtards en mâles alors qu'une température basse à 10° C produit une majorité de femelles. Ces résultats ont été confirmés par différents auteurs, PRIQUET (1930), UCHIDA (1937) qui ont travaillé sur différentes espèces de Batraciens.

Quels sont les facteurs responsables de cette inversion sexuelle ?

WITSCHI admet, soit une destruction de la substance femelle par la chaleur, soit un arrêt de la sécrétion de cette substance. Et. WOLFF (1946) émet l'hypothèse que des variations métaboliques produites dans l'organisme par des facteurs externes pourraient modifier les sécrétions hormonales.

Chez les Oiseaux, les variations de la température d'incubation influent sur

les caractères sexuels des embryons de Poulet. Ces modifications sont nettement moins accentuées que dans le cas des Batraciens et ne concernent que le tractus génital ; les gonades évoluent normalement suivant leur sexe génétique.

E. WILLIER et C. YUH (1928) signalent la persistance des canaux de Müller chez le mâle et du canal de Müller droit chez la femelle après action d'une température basse (24° et 27° C) appliquée vers le 8^e jour de l'incubation. R. STOLL (1948) obtient le même résultat en exposant les embryons à une température d'incubation supérieure à la normale, à 40°5 à partir des stades 2, 5, 7 ou 8 jours jusqu'à la fin de l'incubation (14 à 20 jours). Les conduits müllériens mâles, au lieu de régresser, persistent entièrement ou sous forme de rudiments. Le canal droit de l'embryon femelle est également maintenu. Ainsi de faibles variations de température déterminent l'évolution anormale du tractus müllérien chez l'embryon de Poulet. Les mêmes résultats ont été obtenus par Et. WOLFF (1949) chez les Oiseaux et par JOST (1946) chez les Mammifères après castration des gonades embryonnaires. Ces expériences prouvent qu'une insuffisance de sécrétion d'hormone mâle due à l'absence ou à la déficience du testicule est responsable de la persistance des canaux.

Récemment H. LUTZ et Y. LUTZ-OSTERTAG (1956), étudiant l'action des ultra-sons sur l'embryon de Poulet âgé de 6 jours, obtiennent un effet comparable à celui d'une élévation de température : le maintien des canaux de Müller chez le mâle. Des expériences réalisées sur des canaux explantés *in vitro* mettent en lumière l'action directe des ultra-sons sur l'évolution de ces canaux. On sait que la régression de ces derniers est un phénomène de nécrose provoqué par l'hormone mâle (Et. WOLFF et Y. OSTERTAG, 1952). Cette régression est en outre liée à la présence d'une enzyme de nature protéolytique qui, activée par l'hormone mâle, digère les tissus nécrosés (Travaux D. SCHEIB-PFLEGER, 1955).

Les ultra-sons agiraient directement sur cette enzyme et empêcheraient ainsi la disparition des canaux de Müller chez l'embryon mâle.

L'ensemble de ces travaux montre que des facteurs physiques variés agissent sur la morphologie sexuelle. Il est intéressant de constater que des influences externes parfois banales, telles que de faibles variations de température, miment des actions hormonales. On admet que les sécrétions d'hormones sont inhibées ou modifiées par ces agents mais la nature et le mécanisme intime de ces réactions sont encore peu connus.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A. — Matériel et techniques expérimentales.

La plupart des œufs utilisés sont ceux de poules Leghorn blanches. Dans quelques cas, les expériences ont porté sur des œufs provenant d'un croisement de poules Light Sussex blanches et de coqs Rhode Island rouges. La coloration du plumage de ces oiseaux est un caractère lié au sexe : les mâles génétiques ont un duvet blanc alors que les femelles ont un duvet rouge. Cette différence de teinte, déjà nette au 14^e et 15^e jour de l'incubation, permet de savoir à l'autopsie si on est en présence de femelles ou de mâles génétiques.

Enfin certaines expériences ont été réalisées sur des embryons de canard de races Khaki Campbell et Pékin.

Une ouverture est pratiquée au pôle supérieur de l'œuf, vers le stade de 48 heures, et recouverte d'une lamelle de mica, selon la technique mise au point par Et. WOLFF (1936).

1. — IRRADIATION AUX RAYONS X

Les radiations utilisées sont les rayons X. Les appareils générateurs de rayons X : « Tubix » et « Picker X Rays », à l'anticathode de tungstène fonctionnent l'un sous une tension de 60 kV et une intensité de 4 mA, l'autre sous une tension de 60 kV et une intensité de 8 mA. La distance de l'anticathode à la fenêtre de l'œuf est de 12 centimètres, et la durée d'irradiation varie entre 2 minutes et 10 minutes. Les doses totales administrées à l'embryon s'échelonnent entre 300 r et 3.000 r. Ces mesures sont faites sans tube localiseur. Deux séries d'irradiation ont été effectuées :

1) des irradiations *in toto* : tout le faisceau de rayons X sortant d'une fenêtre de 6 centimètres de diamètre est utilisé. L'embryon est entièrement irradié ;

2) des irradiations localisées : le faisceau canalisé par un cylindre de plomb n'irradie qu'une faible partie de l'embryon.

a) *Irradiation in toto.*

Une première série d'œufs est soumise à une irradiation totale. Tout le blastoderme est exposé à l'action des rayons. L'œuf, dont le mica est remplacé par une lamelle de cellophane pendant l'irradiation, est amené au-dessous du tube à rayons X, à 6 centimètres de distance de ce dernier. On se sert d'un fil à plomb pour centrer exactement l'embryon sur la source des rayons. La distance de l'anticathode à l'œuf est de 12 centimètres, et la durée totale d'irradiation est de 4 minutes. Dans la plupart des cas, cette même dose au lieu d'être appliquée en une seule fois, l'est en deux fois avec un intervalle de 24 à 48 heures. L'action des rayons est ainsi moins brutale. Les expériences sont effectuées soit à un stade précoce : 2 à 3 jours de l'incubation, soit à un stade plus tardif : 6 à 8 jours. La mortalité est considérable ; quelques embryons seulement atteignent le stade de la différenciation sexuelle.

b) *Irradiation localisée.*

La technique des irradiations *in toto* ne s'étant pas révélée satisfaisante, en particulier pour les jeunes stades, une autre méthode a été utilisée. C'est le dispositif d'irradiations localisées mis au point par P. ANGEL et E. WOLFF (1933) et dont je rappellerai succinctement la technique.

Dans le cas d'une irradiation totale, on utilise de larges faisceaux de rayons X, la localisation est donc peu précise, tout l'embryon est irradié. Dans le cas d'une irradiation régionale, les faisceaux sont canalisés dans un cylindre de plomb de 50 millimètres de long fixé au tube de rayons X. Ce

localiseur présente une ouverture de 3 millimètres de diamètre ; ainsi un territoire correspondant à 3 millimètres (12 à 13 somites) est irradié. Dans nos expériences, la région des glandes génitales est seule soumise à l'action du rayonnement.

Au stade 26 à 30 somites, un écran est placé au niveau du 17^e, un autre en arrière du 26^e, vers le 30^e somite (fig. 1). Toute la zone comprise entre ces 2 limites (écrans E₁ et E₂, fig. 1) est exposée aux rayons. Chez les

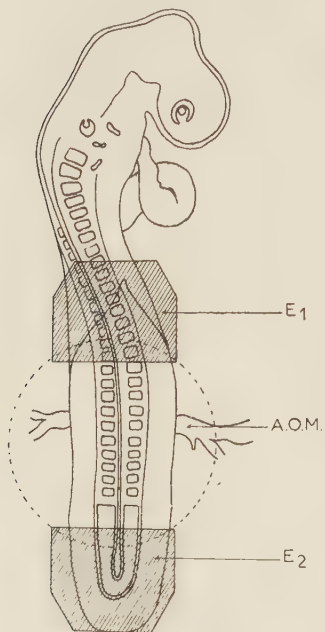


Fig. 1.

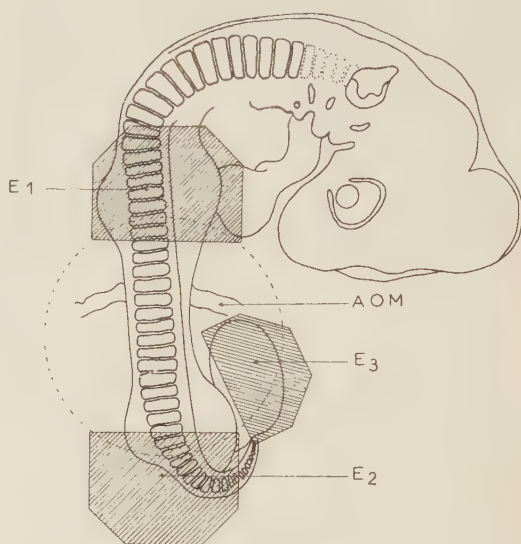


Fig. 2.

Fig. 1 et 2. — Schéma de la localisation de l'irradiation dans les expériences de stérilisation et d'intersexualité de l'embryon de poulet et de canard. Toute la zone comprise entre les deux écrans de plomb E₁ et E₂ est exposée aux rayons X. A.O.M., artère omphalo-mésentérique.

Fig. 1. — Schéma d'un embryon âgé de 48 heures (26 somites).

Fig. 2. — Schéma d'un embryon âgé de 3 jours 1/2.

embryons âgés de 3 à 4 jours, un 3^e écran E₃ protège l'allantoïde (fig. 2). Parfois aussi, à ce stade un seul écran en plomb est placé sur la moitié du bourgeon de patte ; une aire de 3 millimètres de longueur en avant de l'écran sera irradiée.

L'œuf est amené sous le localiseur ; à la partie supérieure de ce dernier se trouve un prisme à réflexion totale. L'œuf est éclairé par transparence ; on distingue dans le prisme le germe et la position des écrans grâce auxquels, il est possible de repérer exactement le territoire qu'on veut irradier. Pen-

dant l'irradiation, on enlève le prisme, et après l'expérience, on contrôle la position des écrans : un léger déplacement de ces derniers au cours de l'irradiation, entraîne l'élimination des embryons. Cet accident se produit fréquemment dans le traitement des embryons âgés (3 jours $1/2$ à 4 jours).

Cette technique présente ainsi l'avantage sur l'irradiation totale de n'irradier qu'une faible partie de l'embryon, la région génitale, sans léser les autres territoires vitaux de l'organisme. Cependant le stade d'intervention est limité, la mise en place des écrans ne pouvant plus s'effectuer après le 4^e jour de l'incubation. Aussi dans les nombreuses expériences où l'irradiation s'effectue en 2 temps, l'irradiation régionale fut suivie 24 heures ou 48 heures plus tard d'une irradiation totale.

La plupart des embryons ainsi traités sont autopsiés entre le 15^e jour et le 20^e jour de l'incubation, stades auxquels la différenciation sexuelle est nette. Souvent on note dans le développement, un léger retard dû à l'irradiation.

c) Irradiation des gonades explantées *in vitro*.

Nous avons complété les expériences précédentes par l'étude de l'action des rayons X sur les glandes génitales cultivées *in vitro*. La technique de culture d'organes mise au point par E. WOLFF et K. HAFEN (1951) permet d'isoler les gonades et conduits génitaux et d'étudier ainsi l'action directe du rayonnement sur ces organes. Les expériences ont été réalisées, d'une part sur des gonades indifférenciées d'embryons de canard âgés de 8 jours, et d'autre part sur des gonades déjà différenciées en ovaires et testicules provenant d'embryons âgés de 9 jours ou 10 jours. L'explant prélevé délicatement est placé au fond d'une salière sur un milieu constitué de gélose, d'extrait embryonnaire et de Tyrode. Pendant l'irradiation, le couvercle de verre de la salière est remplacé par une feuille de papier cellophane stérile. L'organe est irradié dans les mêmes conditions que l'embryon dans l'œuf, à une distance de 12 centimètres de l'anticathode sous une tension de 60 kV et une intensité de 8 mA.

L'irradiation effectuée sans tube localiseur, a lieu 15 heures ou 24 heures après la mise en culture de l'organe, et le temps d'exposition aux rayons X varie entre 2 et 10 minutes. Après 3 à 6 jours de culture, les gonades sont fixées et soumises à l'examen histologique.

2. — ELÉVATION DE LA TEMPÉRATURE DE LA COUCHEUSE

Selon la technique de STOLL (1948), les embryons de poulet sont soumis à certains stades de leur développement à une température d'incubation supérieure à la normale. Tandis que cet auteur prolongeait le traitement jusqu'au stade de l'autopsie, nous avons limité l'intervention aux stades critiques de la différenciation sexuelle. Les œufs incubés à 38° pendant les premières phases du développement, sont ensuite portés à partir des stades 6, 7 et 8 jours dans une couveuse réglée à 41° où ils évoluent pour une durée de 2 ou 3 jours. Après ce court traitement à température élevée, les embryons poursuivent leur

développement dans des conditions normales jusqu'au stade de l'autopsie, qui se situe entre 16 et 20 jours de l'incubation.

Pour étudier les effets d'une élévation de la température d'incubation sur les glandes génitales, ces dernières cultivées *in vitro*, au stade de 9 à 10 jours sont également soumises à une température de 41° à 43°. Des températures plus élevées nuisent à l'évolution des organes et la nécrose totale se manifeste quelques heures après l'explantation.

B. — Techniques histologiques.

Les embryons sont sacrifiés à différents stades du développement, mais de préférence, si la survie le permet, à un stade où la différenciation sexuelle est nette. Aussi, la plupart des autopsies ont-elles lieu entre 16 et 20 jours. Quant aux gonades explantées *in vitro* à l'âge de 9 à 10 jours, elles évoluent sur le milieu de culture pendant 3 à 6 jours. Dans tous les cas, les glandes génitales sont fixées au liquide de Bouin, coupées à une épaisseur de 5 μ , puis colorées à l'Hémalun de Mayer-Eosine ou à l'hématoxyline ferrique de Heidenhain.

CHAPITRE III

ACTION DES RAYONS X

A. — Etude expérimentale.

Au cours des expériences qui vont suivre, des embryons dont le stade varie entre 2 et 8 jours sont soumis à l'action des rayons X. L'irradiation est totale ou localisée. Dans le premier cas, l'embryon entier est exposé à l'action du rayonnement, dans le second cas, seule la région des glandes et des conduits génitaux est irradiée. L'emploi combiné des deux techniques s'est révélé nécessaire. Le stade d'intervention, dans le cas d'une irradiation localisée est strictement limité ; au delà de 4 jours 1/2 d'incubation, il est difficile de placer des écrans sur l'embryon enveloppé par ses annexes. Pour des stades âgés, compris entre 6 et 10 jours, nous avons eu recours d'une part à l'irradiation *in toto*, d'autre part à l'irradiation directe des organes sexués cultivés *in vitro*.

1. — IRRADIATION *in toto*

Les expériences ont porté sur des stades précoces : 20 à 37 somites, soit 2 à 3 jours de l'incubation et sur des stades plus avancés : 6 à 9 jours de l'incubation.

a) *Irradiation totale des embryons âgés de 20 à 37 somites.*

Les doses sont administrées en une seule séance ou en deux séances à l'intervalle de 24 ou 48 heures. Dans le premier cas, la mortalité est très élevée; ainsi sur 18 embryons irradiés pendant 2 ou 3 minutes à 60 kV, 4 mA et à 12 centimètres de distance de l'anticathode, 11 meurent avant le 8^e jour de l'incubation, les 7 autres ne dépassent pas le stade de 9 jours.

La même irradiation, échelonnée en deux temps, favorise la survie de quelques individus jusqu'au stade de 13 jours. Sur 77 embryons, 31 atteignent l'âge de 5 et 13 jours. Parmi ces embryons se trouvent 11 mâles et 15 femelles. Les autres ont été fixés à des stades trop précoces pour que leur sexe puisse être identifié. L'étude histologique des glandes génitales des survivants révèle une différenciation sexuelle normale et la présence de nombreux gonocytes.

La durée maxima à laquelle j'ai pu soumettre les embryons est 4 minutes soit 2 minutes d'irradiation, à 24 heures ou 48 heures d'intervalle. La mortalité est considérable :

Sur 19 irradiés : 6 embryons évoluent jusqu'au 12^e, 14^e et un jusqu'au 16^e jour de l'incubation. Les gonades sont partiellement stériles. Un seul embryon (n° 343), autopsié au stade 16 jours a des testicules vides de gonocytes.

L'irradiation totale des embryons de poulet à des stades précoces provoque un retard considérable du développement et l'apparition de nombreuses malformations qui nuisent à l'évolution normale des sujets ainsi traités. Pour remédier à cet inconvénient, la technique d'irradiation totale a été remplacée par une technique plus précise, celle des irradiations localisées.

b) *Irradiation des embryons âgés de 6 à 9 jours.*

Bien que plus âgé, l'embryon exposé en entier, à l'action du rayonnement reste très sensible; les doses administrées sont cependant supérieures à celles qui ont été utilisées dans les expériences précédentes, mais la mortalité est élevée. Une durée d'irradiation de 4 minutes (Appareil Picker X Rays : 60 kV, 8 mA, distance de l'œuf à l'anticathode : 12 centimètres) provoque en 24 heures la mort de tous les embryons. Pour obtenir une meilleure survie, nous avons également procédé à des irradiations de courte durée mais échelonnées sur plusieurs jours. Une durée d'exposition de 2 minutes aux rayons X à l'âge de 6 jours puis à l'âge de 8 jours a donné les meilleurs résultats.

Sur 16 embryons irradiés, 6 ont atteint le stade de 16 jours, 2 sont de sexe femelle. Chez 4 sujets sur 4, on observe des anomalies du tractus génital.

2. — IRRADIATION LOCALISÉE DES EMBRYONS

Les embryons sont soumis aux rayons X pendant 5 à 10 minutes (Appareil Tubix : 60 kV, 4 mA, distance de l'œuf à l'anticathode : 12 centimètres). Seul, le territoire correspondant à l'emplacement des ébauches génitales est irradié. Il se situe entre le 19^e et le 29^e somite. Des sections transversales faites à ces niveaux ont permis de le repérer.

1^{re} SÉRIE : La région des glandes génitales est exposée à l'action des rayons X pendant une durée de 9 et 10 minutes.

Sur 24 embryons irradiés : 20 sont morts entre le 9^e et le 11^e jour de l'incubation. 4 sont prélevés vivants :

3 sont âgés de 13 jours. 1 est autopsié à 9 jours.

Parmi les 4 survivants, 3 embryons (n°s 203, 212 et 217) sont dépourvus de gonades, ce sont des castrats (La technique est voisine de celle des castrations

embryonnaires utilisées par E. WOLFF (1949). Chez les embryons morts à un stade précoce, on observe une réduction considérable des glandes génitales; l'examen histologique des gonades de l'un d'entre eux (n° 401 ♂) a révélé la présence de gonocytes. La mortalité est grande; la région exposée aux rayons X est moins bien développée que les autres parties du corps. La plupart des embryons sont cœlosomiens. On observe d'une part, la réduction des corps de Wolff qui prennent souvent un aspect lacuneux, d'autre part l'absence ou la réduction des gonades et du tractus génital.

2^e SÉRIE : La durée d'irradiation est de 5 et 8 minutes. Les expériences précédentes ont montré qu'il est nécessaire de diminuer la dose pour obtenir des embryons dépassant le stade 10 jours et dont les glandes génitales sont bien constituées.

Sur 87 irradiés : 59 sont morts à un stade précoce. 28 ont vécu pour la plupart jusqu'au 13^e jour de l'incubation : 12 embryons sont de sexe mâle, 16 embryons sont de sexe femelle.

Il ressort de ce groupe d'expériences que des doses élevées provoquent la mort d'un grand nombre d'embryons. Chez la plupart des survivants, les glandes génitales sont réduites. Mais elles renferment encore des cellules germinales, qui sont dans certains cas, distribuées uniquement aux extrémités de la glande génitale ou bien forment localement de petits amas.

Aucun sujet complètement stérile n'a pu être obtenu par cette méthode. Quelques-uns le sont partiellement (nos 232, 236, 237, 241, 279, 282, 297, 317). Un embryon (n° 298) non stérile, génétiquement mâle, autopsié le 13^e jour présente des caractères d'intersexualité.

3. — EMPLOI COMBINÉ DES IRRADIATIONS TOTALES ET LOCALISÉES

L'irradiation se fait en 2 étapes : une irradiation régionale au stade 2 à 4 jours d'incubation suivie d'une irradiation totale, 24 heures ou 48 heures plus tard. L'expérience réciproque a également été effectuée. De jeunes embryons âgés de 16 à 26 somites ont été ainsi soumis entièrement à l'action du rayonnement X et 1 ou 2 jours plus tard à une irradiation localisée. La plupart des expériences intéressent l'embryon de poulet; quelques-unes ont été réalisées sur l'embryon de canard.

a) Irradiation des embryons de poulet.

La plupart des expériences ont été effectuées avec l'appareil « Tubix » fonctionnant sous 60 kV et 4 mA, distance de l'anticathode à l'œuf : 12 centimètres.

1^{re} SÉRIE : Irradiation localisée (stade 48 heures au stade 96 heures).

Irradiation totale 24 heures ou 48 heures plus tard.

1. *Temps d'irradiation* : 7 minutes (irradiation localisée) + 2 minutes (irradiation totale).

Sur 45 embryons irradiés : 21 sont morts entre le 6^e et le 9^e jour de l'incubation. 24 évoluent jusqu'au 15^e jour :

15 sont de sexe femelle. 9 sont de sexe génétique mâle.

Parmi ces derniers : 7 sont intersexués : 311, 312, 380, 404, 413, 446, 375. 2 sont stériles : 313 ♀, 312 ♂. La plupart sont incomplètement stériles.

2. *Durée d'irradiation* : 6 minutes (irradiation localisée) + 2 minutes (irradiation totale).

Sur 39 embryons irradiés : 25 meurent avant le 9^e jour de l'incubation. 14 évoluent jusqu'au 15^e jour :

6 sont de sexe femelle. 8 sont des mâles génétiques.

Parmi ces derniers : 5 sont intersexués : 324, 326, 327, 328, 387. 3 sont stériles : 319 ♀, 327 ♂, 310 ♀. Une forte proportion est partiellement stérile.

2^e SÉRIE : Irradiation totale de courte durée : 2 minutes.

Irradiation localisée 24 heures ou 48 heures plus tard, durée 7 et 8 minutes.

Sur 27 embryons traités par les rayons X : 17 meurent à un stade précoce. 10 évoluent jusqu'au 15^e et 16^e jour de l'incubation.

Parmi eux se trouvent : 6 de sexe femelle. 4 de sexe génétique mâle.

1 embryon présente des caractères d'intersexualité (n° 416). 3 embryons sont stériles : 353 ♀, 344 ♀, 352 ♂.

Quelques expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions avec un autre appareil à rayons X (Picker X Rays 60 kV, et intensité de 8 mA); la distance de l'anticathode à la fenêtre de l'œuf est de 12 centimètres. Les irradiations sont effectuées pendant 4 et 5 minutes.

48 embryons sont irradiés : 12 évoluent jusqu'au 15^e jour :

7 sont de sexe femelle. 5 sont de sexe génétique mâle.

Parmi eux : 2 sont des intersexués. La plupart des gonades sont partiellement stériles.

b) Irradiation des embryons de canard.

Les embryons de canard ont été soumis à l'action des rayons X dans les mêmes conditions que les embryons de poulet. L'irradiation localisée, effectuée au stade : 2 à 4 jours est suivie 24 heures ou 48 heures plus tard d'une irradiation totale ou dans certains cas d'une seconde irradiation localisée. Le temps d'exposition aux rayons X est de 8 et 9 minutes (à 60 kV, 4 mA, 12 centimètres de distance), de 5, 6 et 8 minutes (60 kV, 8 mA, 12 centimètres de distance).

Sur un total de 80 embryons irradiés : 42 sont morts. 38 sont autopsiés aux stades 19 à 21 jours de l'incubation :

24 sont de sexe mâle à l'aspect extérieur. 14 sont de sexe femelle.

Parmi les mâles : 19 présentent des anomalies du tractus génital et 3 sur 6 gonades soumises à l'étude histologique ont des signes légers d'intersexualité.

4. — IRRADIATION DES ORGANES EXPLANTÉS « IN VITRO »

Afin de compléter les expériences concernant l'action des rayons X sur les caractères sexuels de l'embryon d'oiseau, je me suis adressée à la technique des cultures d'organes mise au point par E. WOLFF et K. HAFEN (1951). Elle permet de dissocier le complexe gonades et conduits génitaux et d'étudier l'action de facteurs extérieurs directement sur ces organes pris isolément. De plus, l'organisme étant éliminé, des doses importantes peuvent être administrées. Enfin, grâce à cette technique, l'irradiation directe de gonades âgées de 9 à 10 jours devient possible.

La plupart des expériences ont porté sur des testicules et ovaires âgés de 9 et 10 jours, donc sexuellement différenciés. Des essais effectués sur des stades précoces (6 ou 7 jours) n'ont pas donné de résultats. L'évolution sexuelle des organes cultivés puis irradiés est en effet insuffisante pour distinguer avec certitude les femelles d'intersexués éventuels.

Au total 22 ♂ et 14 ♀ âgés de 9 à 10 jours ont été soumis à l'action du rayonnement. La durée d'irradiation varie entre 4 et 10 minutes (à 60 kV, 8 mA, 12 centimètres de distance de l'anticathode). 9 testicules et 4 ovaires sont complètement stériles, les autres le sont partiellement.

L'évolution sexuelle est normale pour des doses faibles. Au contraire, elle est peu nette pour des doses élevées ; la structure des glandes génitales est ramenée à un état indifférencié.

5. — CONCLUSIONS

De l'ensemble de ces expériences, il ressort nettement que c'est la technique d'irradiation localisée, suivie d'une irradiation totale qui a permis d'obtenir des résultats intéressants. Grâce à l'irradiation régionale, les organes essentiels de l'embryon sont protégés. Enfin l'embryon est moins sensible à une dose de rayons X appliquée en deux fois qu'à l'action de cette même dose administrée en une séance.

La mortalité atteint environ la moitié des sujets irradiés ; elle se manifeste surtout entre le 6^e et le 9^e jour de l'incubation. En général, dans ces cas, l'allantoïde se développe mal et n'enveloppe pas complètement l'embryon. Ces stades dépassés, il vit facilement jusqu'au 15^e et 20^e jour de l'incubation.

Les embryons, autopsiés pour la plupart le 15^e jour, présentent un aspect anormal. Souvent les membres postérieurs sont absents ou réduits, un certain nombre d'individus sont cœlosomiens.

Les cellules germinales sont les éléments les plus sensibles à l'action des rayons X ; cependant, les parties somatiques de la glande ne sont pas épargnées. Tantôt la taille de la gonade est réduite, tantôt celle-ci est morcelée. En culture également, on observe une inhibition considérable de la croissance.

L'action combinée de ces différentes techniques d'irradiation nous a donné des résultats qui seront exposés dans les prochains chapitres.

1. La stérilisation totale ou partielle des glandes mâles et femelles.
2. L'intersexualité des gonades mâles dans certaines conditions d'irradiation.
3. La persistance de canaux de Müller chez les embryons de sexe mâle.

B. — Caractères morphologiques et histologiques des glandes génitales normales.

Les embryons sont soumis à l'action localisée des rayons X à des stades précoces variant entre 48 heures et 96 heures de l'incubation.

Les expériences sont donc effectuées au moment où la glande génitale n'est pas encore différenciée. L'ébauche génitale, à ces stades, apparaît du côté ventral de l'ébauche mésonéphritique sous forme d'un petit massif (fig. 3). Des cellules germinales y sont déjà incorporées. Ces éléments, d'abord localisés dans l'épithélium germinatif en bordure de la gonade, vont être amenés à l'intérieur, au cours des poussées successives des cordons sexuels primaires et secondaires.

À 6 jours, les gonades forment deux masses grêles et allongées. La différenciation sexuelle s'effectue entre le 7^e et le 8^e jour de l'incubation. À 9 et 10 jours, stades de l'irradiation des gonades explantées *in vitro*, ovaires et testicules sont nettement différenciés et les gonocytes y sont nom-

breux. La plupart des embryons irradiés dans l'œuf sont autopsiés vers le 15^e jour de l'incubation. A ce stade, l'appareil génital est différencié dans



Fig. 3. — Schéma de la coupe transversale d'un embryon âgé de 3 jours 1/2.
T.N., tube nerveux; Ch., chorde; V.C. veine cardinale; Ao., aorte; C.W., canal de Wolff; M., mésonephros; E.G., ébauche génitale.

les deux sexes. Son aspect morphologique et histologique a été décrit par de nombreux auteurs; rappelons brièvement ses caractères principaux :

1. — EVOLUTION DE L'APPAREIL GÉNITAL MALE

Les deux gonades en forme de boyaux cylindriques et allongés sont situées du côté du mésonephros. Leur section est généralement circulaire et régulière. Elles sont constituées de cordons testiculaires sinueux, qui plus tard se transforment en tubes par suite de la résorption de la zone axiale claire. Ces cordons sont séparés les uns des autres par un tissu conjonctif mésenchymateux. Les cellules germinales se dispersent, soit dans la zone claire du cordon, soit entre les cellules de Sertoli qui sont les éléments somatiques de la paroi du tube. Une membrane mince de revêtement composée de cellules aplaties enveloppe le testicule. Entre cette membrane et les cordons testiculaires apparaît une masse mésenchymateuse : l'albuginée.

Les conduits génitaux ou canaux de Wolff, symétriques de chaque côté, vont du mésonephros au cloaque.

2. — EVOLUTION DE L'APPAREIL GÉNITAL FEMELLE (fig. 1 et 2, Pl. XI)

L'ovaire gauche, aplati et large est très développé et recouvre une partie du mésonephros. La gonade droite, par contre est petite et rudimentaire. L'étude histologique de la glande génitale gauche montre un épithélium germinatif constitué de cellules cylindriques. En dessous, s'étend la zone corticale très épaisse, formant des lobulations vers la partie interne de l'ovaire. Elle renferme des amas de grosses cellules claires qui sont les ovogonies. Enfin la partie adjacente au mésonephros, est une zone formée d'un tissu lâche à grandes lacunes qui contient quelques gonocytes. C'est la médullaire. La gonade droite est réduite à une région lacunaire ; elle ressemble à la partie médullaire de la glande génitale gauche.

Le canal de Müller, développé sur toute sa longueur du côté gauche, comprend un pavillon, une trompe, et dans la région postérieure, un renflement vésiculeux : la glande coquillière. Du conduit droit, il ne subsiste qu'un petit tronçon de canal qui aboutit comme le canal gauche au cloaque. C'est le reste du canal de Müller droit qui régresse à partir du 12^e jour de l'incubation.

3. — CARACTÈRES DES ÉLÉMENTS GERMINAUX.

Ils ont été décrits par de nombreux auteurs, dans les groupes d'animaux les plus divers. Des caractères morphologiques précis permettent de distinguer les cellules germinales des cellules somatiques. Ces dernières sont petites alors que les gonocytes se reconnaissent à leurs grandes dimensions, leur forme circulaire, leur cytoplasme clair et abondant qui renferme des gouttelettes vitellines, leur noyau volumineux. Certains auteurs soulignent l'importance de traits cytologiques, absents dans les cellules somatiques ; par exemple l'aspect granuleux des chondriosomes qui auraient la forme de bâtonnets dans les éléments somatiques (W. RUBASCHKIN (1907) et S. TSCHASCHIN (1910)). Ce caractère est contesté par SWIFT (1915-1916) qui attribue aux gonocytes des Oiseaux un noyau gros et arrondi et une grande sphère attractive. GOLD-SMITH en 1928 confirme ces observations. Au stade où nous fixons les gonades, les cellules germinales volumineuses et claires, pourvues d'un gros noyau se détachent nettement des cellules somatiques plus petites. Elles sont groupées en amas compacts dans le cortex ovarien et sont disséminées dans les cordons testiculaires.

4. — DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DES GONADES EN CULTURE.

Cette évolution sera décrite dans la deuxième partie. Signalons, cependant, que l'ovaire cultivé *in vitro* ne se différencie pas normalement mais évolue en ovotestis, à cortex ovarien et à médullaire formée de cordons testiculaires. Le testicule, au contraire, présente un développement typique (Travaux E. WOLFF et K. HAFFEN, 1952). Ainsi l'irradiation en culture s'effectue sur des testicules normalement constitués et sur les ovaires de structure aberrante.

C. — Stérilisation des embryons de poulet.

I. — RÉSULTATS.

La stérilisation a été obtenue selon deux techniques différentes, d'une part, en irradiant les embryons *in situ* à un stade précoce de leur développement, d'autre part en soumettant aux rayons X les organes isolés de l'organisme âgé de 10 jours et cultivés *in vitro*. La première technique présente sur la seconde l'avantage de pouvoir travailler à des stades précoces ; la seconde technique permet d'administrer des doses élevées et d'étudier les effets directs du rayonnement sur l'organe explanté à un stade tardif du développement.

Dans les deux cas, les meilleurs résultats s'obtiennent après une irradiation fractionnée, donnée en 2 étapes à intervalle de 24 ou 48 heures.

Dans le cas d'une irradiation localisée, associée à l'irradiation totale, 9 embryons complètement stériles ont été obtenus : 5 sont femelles (n° 313, 310, 318, 344, 353) ; 2 sont mâles (n° 352, 343) ; 2 sont intersexués (312, 327).

Dans le cas d'une irradiation en culture :

9 gonades mâles et 4 gonades femelles sont complètement stériles :

♂ : I 74, I 78, I 80, I 82, I 99, I 100, I 101, I 102, I 107 ;

♀ : I 77, I 85, I 87, I 110.

Un grand nombre de gonades sont partiellement stériles ; elles ne renferment souvent qu'une dizaine à une cinquantaine de gonocytes.

2. — STRUCTURE HISTOLOGIQUE DES GONADES STÉRILES.

Dans la plupart des cas, les glandes génitales possèdent la structure caractéristique d'un ovaire et d'un testicule. Elles en diffèrent seulement par l'absence de gonocytes. Les éléments somatiques sont alors bien différenciés : tubes testiculaires chez le mâle, cortex et médullaire lacuneuse chez la femelle. Dans d'autres cas, les régions somatiques sont aussi atteintes ; on observe une inhibition corticale et médullaire chez la femelle, et des phénomènes d'intersexualité chez le mâle.

a) Aspect de l'ovaire stérile.

L'absence de cellules germinales confère au cortex un aspect très particulier et varié.

Les cordons de Pflüger en forme de capsules sont reliés à l'épithélium, mais les amas d'ovogonies qui s'y trouvent normalement ont disparu. Les cellules restantes sont petites, aplaties, toutes identiques, d'aspect allongé et fusiforme, orientées dans la même direction (fig. 5, Pl. XI).

La structure de cet ovaire est en tout point semblable à celle d'une gonade normale. Seules les cellules germinales sont absentes. Dans de nombreux cas, l'inhibition n'atteint pas seulement les gonocytes, mais l'ensemble du cortex.

— Parfois, les nids à ovogonies disparaissent, faisant place à une zone de vacuoles ou de lacunes, dans lesquelles on aperçoit quelques noyaux isolés (fig. 6, Pl. XI). L'épithélium germinatif est souvent réduit à une seule assise cellulaire.

— D'autres ovaires présentent, au contraire, d'importantes expansions épithéliales qui leur donnent un aspect plus ou moins tourmenté (fig. 7, Pl. XI).

— Dans les cas d'inhibition les plus accentués, le cortex a totalement régressé, ou bien il est notablement réduit. La médullaire aussi est affectée, occupée par un vaste réseau de lacunes (fig. 3 et 4, Pl. XI).

Il convient de remarquer que de telles gonades ont une structure voisine de gonades droites normales ou de testicules cultivés *in vitro* et traités par la trypaflavine (voir deuxième partie, page 405).

Ces expériences montrent que, si l'action des rayons X s'exerce ainsi de préférence sur les cellules germinales, les parties somatiques n'en sont pas moins touchées et révèlent différents degrés d'inhibition.

Les gonades explantées *in vitro* et soumises à l'action des rayons X, à un stade où le cortex est truffé de cellules germinales, suivent le même sort que les gonades irradiées *in vivo* à un stade précoce.

Après 4 à 6 jours de culture, l'étude histologique révèle un cortex constitué de noyaux somatiques, d'aspect fusiforme, auxquels viennent se mêler des noyaux en pycnose et de petites vacuoles. Ce cortex est souvent peu distinct de la médullaire. Celle-ci est de structure compacte, constituée de cordons testiculaires, dans le cas d'une faible irradiation (4 minutes d'exposition). Elle dégénère cependant et perd sa structure testiculaire après une irradiation d'une durée de 8 à 10 minutes. Un tissu désorganisé, indifférencié, renfermant des noyaux pycnotiques et des vacuoles remplace cette médullaire normalement compacte. Des formations typiquement lacunaires n'ont jamais été observées.

b) *Etude du testicule stérile.*

Il est caractérisé par l'absence des éléments germinaux (fig. 19, Pl. XIII); la structure est normalement conservée. Les gonocytes étant davantage dispersés dans les tubes que dans le cortex, la stérilisation complète est plus facile à obtenir que dans le cas des ovaires. Le testicule cultivé *in vitro* suit la même évolution; des signes de dégénérescence n'apparaissent qu'avec des doses élevées: inhibition de la structure testiculaire, apparition de zones de nécrose.

3. — CONCLUSIONS

Comme R. DULBECCO (1946) l'avait déjà signalé, la destruction des cellules germinales à un stade précoce n'empêche pas la formation des glandes génitales, et n'exerce aucune influence sur leurs caractères somatiques; les embryons sont en effet de sexe mâle et de sexe femelle. Les rayons X exercent comme les rayons du radium, une action élective sur les cellules germinales. Ce fait avait déjà été démontré par V. DANTCHAKOFF (1932-1933) qui soumettait des individus plus âgés à l'action de ces rayons.

La stérilisation totale est cependant difficile à obtenir. Dans la plupart des cas, elle est partielle. Parfois, les cellules germinales sont disséminées et peu nombreuses, mais souvent elles apparaissent par petits groupes, localisées par exemple à l'extrémité de la glande génitale. Un repeuplement de la glande est possible par les cellules germinales échappées à l'irradiation. D'autre part, on constate dans l'ensemble de ces expériences qu'une dose stérilisante pour certains individus ne l'est pas pour d'autres ; chez ces derniers, il subsiste souvent un petit nombre de gonocytes localisés à l'extrémité de la gonade.

L'irradiation localisée faite en une seule séance n'a donné aucun résultat. Des embryons stériles ont été obtenus grâce à l'emploi combiné des deux techniques : irradiation localisée et irradiation totale. Pour expliquer ces faits, on peut émettre 3 hypothèses :

1) La région renfermant les ébauches gonadiques n'est pas entièrement irradiée ; la localisation est donc insuffisante.

Or les expériences ont montré que des doses suffisamment élevées déterminent la destruction des gonades. Leurs ébauches ont donc été exposées aux rayons.

2) Au stade 26 à 37 somites, les cellules germinales ne sont pas toutes en place dans l'ébauche gonadique. Un certain nombre y sont incorporées comme le démontrent les sections faites dans cette région. Une partie de ces éléments est peut-être encore en voie de migration et une 2^e dose totale les éliminerait sinon complètement, du moins en grande partie.

3) Enfin deux doses administrées à 1 ou 2 jours d'intervalle sont plus efficaces dans la destruction des éléments germinaux qu'une dose appliquée en une seule séance.

Les expériences réalisées en culture semblent confirmer cette dernière hypothèse. En effet, malgré l'action directe des rayons X et l'administration d'une dose élevée, les irradiations effectuées en deux temps sont plus efficaces qu'une seule. Au cours d'une première irradiation, certains éléments germinaux ne subiraient qu'une atteinte partielle et seraient ainsi sensibles à une 2^e dose.

D. — Etude des embryons intersexués.

Les glandes et conduits génitaux de nombreux embryons mâles, autopsiés entre le 15^e et le 20^e jour de l'incubation, présentent des caractères nets de féminisation (E. WOLFF et B. SALZGEBER, 1949). L'étude histologique permet de confirmer ces observations morphologiques.

1. — RÉSULTATS

Au total 16 intersexués ont été obtenus chez le poulet. Le plus grand nombre a été soumis à une irradiation localisée (durée : 6 et 7 minutes, 60 kV, 8 mA, distance 12 centimètres) suivie 24 ou 48 heures plus tard d'une irradiation totale (durée 2 minutes). Dans cette série expérimentale, 12 intersexués sur 17 mâles ont été réalisés.

2. — PROCÈS-VERBAL DES EXPÉRIENCES D'IRRADIATION
(EMBRYONS MALES)

TABLEAU I

Nos	Age 1 ^{re} irra- diation (jours)	Age 2 ^e irra- diation (jours)	Durée irra- diation (minutes)	Age Autopsie (jours)	Canaux de Müller	Caractères des gonades (les croix indiquent le degré d'intersexualité)
298	3 1/2	—	8	14	Présents de chaque côté.	♂ +
311	3	5	8-1	15	Gauche long et filiforme. Rudiment droit.	♂ + ×
312	4	6	7-2	17	Gauche long entier. Rudiment droit.	♂ + × >
314	3 1/2	5 1/2	8-2	14	Absents.	♂ normales
324	2 1/2	3 1/2	6-2	15	Canal gauche entier fili- forme, droit absent.	♂ +
326	2 1/2	3 1/2	6-2	15	Gauche entier. Droit absent.	♂ +
327	3	4	6-2	15	Petit résidu à gauche. Droit absent.	♂ +
328	3	4	6-2	15	Rudiments de chaque côté.	♂ + × >
329	3	4	5-2	15	Faibles résidus.	♂ normales
350	2	3	2-6	16	Résidus de chaque côté.	♂ normales
352	2	3	2-5	16	Rudiments filiformes dans la région postérieure.	♂ normales
375	3 1/2	4 1/2	7-2	15	Gauche long et filiforme. Droit absent.	♂ + >
380	3 1/2	4 1/2	7-2	15	Canaux type ♀.	♀ +

Note : Les 2 chiffres de la colonne « Durée d'irradiation » indiquent la durée de la première et de la deuxième irradiation.

TABLEAU I (suite)

N°	Age 1 ^{re} irra- diation (jours)	Age 2 ^e irra- diation (jours)	Durée irra- diation (minutes)	Age Autopsie (jours)	Canaux de Müller	Caractères des gonades (les croix indiquent le degré d'intersexualité)
385	3	4	6-2	15	Résidus faibles.	♂ normales
387	3	4	6-2	15	Canaux de chaque côté.	♂ + × ×
394	2 1/2	3 1/2	6-2	15	2 canaux longs et filiformes de chaque côté.	♂ normales
396	2 1/2	3 1/2	7-2	15	Gauche long et filiforme. Droit absent.	♂ normales
404	3	4	7-2	16	Résidus de chaque côté.	♂ + × ×
413	4	5	7-2	16	Absents.	♂ + ×
415	3	4	2-6	17	Absents.	♂ normales
416	3	4	2-6	17	Gauche long et filiforme avec trompe.	♂ + × ×
446	3 1/2	5 1/2	7-2	15	Canaux présents.	♂ + × ×
456	3 1/2	4 1/2	5-2 Picker	15	Résidus faibles.	♂ + ×
462	3 1/2	4 1/2	5-2 Picker	16	Canaux type ♀.	♂ normales
465	3 1/2	4 1/2	5-2 Picker	15	Absents.	♂ + ×
496	3 1/2	5 1/2	3-2 Picker	15	Gauche entier, filiforme. Droit moins long que le gauche.	♂ normales
501	3 1/2	5 1/2	4-2 Picker	15	Entiers de chaque côté.	♂ normales

Note : Les 2 chiffres de la colonne « Durée d'irradiation » indiquent la durée de la première et de la deuxième irradiation.

Dans la série où la dose totale administrée à un stade précoce précède l'irradiation localisée, un seul intersexué sur 4 mâles a été obtenu.

Les doses précédentes appliquées en une seule séance ont donné un sujet intersexué sur 32 embryons mâles.

Dans une autre série d'expériences, l'irradiation localisée est effectuée avec un appareil à rayons X fonctionnant sous une tension de 60 kV et une intensité de 8 mA.

Deux sujets intersexués sur 5 ont été obtenus.

Enfin pour compléter ce travail, des expériences similaires ont été réalisées sur l'œuf de cane.

Sur les 27 mâles (embryons de poulet), irradiés et autopsiés entre 15 et 17 jours, les anomalies des organes sexuels se répartissent comme suit :

♂ normaux : 2 ;

♂ à testicules, mais présence de canaux de Müller : 9 ;

♂, présence de canaux : 14 ;

+

♂, absence de canaux : 2.

+

L'âge des embryons exposés aux rayons X varie de 2 à 6 jours d'incubation.

La première irradiation a lieu à 3 stades différents :

1. Au stade 24 somites (48 heures d'incubation) ;
2. Au stade 35 à 37 somites. A ce moment, les ébauches de membre sont déjà formées.

3. Entre le 3^e et le 4^e jour de l'incubation ; à ce stade l'allantoïde apparaît.

Les embryons plus âgés n'ont pas été irradiés, l'allantoïde enveloppe tout l'embryon, et une intervention localisée à ces stades devient difficile.

La plupart des embryons irradiés dans ces conditions présentent des anomalies des gonades et du tractus génital : féminisation des organes sexuels d'une part, maintien des canaux de Müller d'autre part. On ne peut cependant produire à volonté un type déterminé d'intersexualité des mâles.

Avec la même dose, on obtient au hasard des transformations plus ou moins intenses.

3. — CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DES GLANDES ET DES CONDUITS GÉNITAUX DES INTERSEXUÉS

Les organes génitaux de la plupart des embryons mâles irradiés présentent un aspect intermédiaire entre la morphologie mâle et la morphologie femelle. La dissymétrie entre les deux gonades, droite et gauche est frappante. Celle de droite est plus grêle, plus allongée que celle de gauche ; c'est un testicule typique. La gonade gauche, au contraire, a évolué en ovotestis ; elle présente à la fois des caractères mâles et des caractères femelles. La figure 9, Pl. XII, représentant l'intersexué n° 4/6 montre nettement cette évolution. La gonade gauche est large, aplatie sur le mésonephros, caractère qui rappelle une morphologie ovarienne. Deux régions sont nettement distinctes : à la partie proximale et distale de la glande, un prolongement cylindrique

présente un aspect testiculaire ; dans la région médiane, une bandelette légèrement crénelée vient se greffer sur le testicule sous-jacent. Dans les cas moins accentués, les deux gonades sont presque de même taille ; cependant de petits mamelons à la surface de l'ovotestis témoignent d'une féminisation partielle de cette glande.

Enfin, dans le cas d'une faible intersexualité, les différences morphologiques entre les deux gonades sont minimales et ne permettent pas de distinguer entre un testicule et un ovotestis éventuel. Seule, l'étude histologique permet alors de donner une réponse.

Le tractus génital des embryons intersexués acquiert comme les gonades, des caractères intermédiaires entre mâle et femelle. Alors que chez le mâle normal âgé de 15 jours, les canaux de Müller ont complètement régressé, des tronçons de ces canaux subsistent de chaque côté des gonades chez la plupart des embryons. La morphologie du tractus génital se présente sous des aspects variés ; dans certains cas, les conduits génitaux rappellent ceux d'une femelle (Exemple fig. 8, Pl. XII, intersexué n° 380) : un canal gauche normalement développé avec trompe et pavillon dans la région proximale, et une glande coquillière dans la zone distale : du côté droit, on reconnaît le rudiment caractéristique d'un canal de Müller droit femelle. Dans d'autres cas, les deux canaux bien développés persistent en entier de part et d'autre des glandes génitales. Ces caractères se retrouvent chez de nombreux intersexués (7). Chez d'autres sujets (4 cas), les canaux sont filiformes quoique développés sur toute leur longueur. Mais ils ne présentent jamais de renflement au voisinage du cloaque.

Chez 3 autres embryons enfin, l'oviducte ne se développe pas entièrement. Il est réduit à sa partie proximale : pavillon et trompe. Le tronçon est absent du côté droit. La fig. 9, Pl. XII montrant l'intersexué n° 446 est un exemple de ce dernier cas. Enfin les canaux sont absents chez 2 intersexués.

4. — CARACTÈRES HISTOLOGIQUES DES GLANDES GÉNITALES DES INTERSEXUÉS

L'étude histologique des glandes sexuelles confirme l'aspect morphologique. La gonade droite évolue comme un testicule typique. La glande génitale gauche présente des signes de féminisation plus ou moins accentués. Etudions quelques types obtenus au cours de ces expériences :

1^{er} groupe : 4 embryons (n° 312, 324, 328 et 380) présentent les caractères les plus accentués d'intersexualité : la gonade gauche est transformée en ovotestis. Elle comprend deux zones bien distinctes que nous avons déjà décelées à l'étude macroscopique : un noyau testiculaire enveloppé d'un cortex ovarien. Celui-ci renferme des cordons de Pfluger, souvent stériles (fig. 10, 11, 12, 13, Pl. XII). Un épithélium germinatif épais et lobé revêt le cortex. Enfin un système de lacunes sépare cette région de structure femelle des formations testiculaires qui occupent la partie basale et centrale de la glande. Les deux zones bien distinctes confinent cependant étroitement l'une à l'autre et on aperçoit dans certains cas (fig. 11, Pl. XII), un de ces tubes arriver au contact d'une lacune. Ces cavités sont larges, de dimensions inégales et

comme chez une femelle normale, on y aperçoit des éléments cellulaires en voie de dégénérescence (fig. 11, Pl. XII).

Dans tous les cas, on a pu noter, à l'autopsie la présence de canaux de Müller.

2° groupe : comprend les intersexués n° 298, 446, 387, 404, 413, 416. Le système lacunaire est absent ou peu développé. Les formations testiculaires, plus étendues que dans le cas précédent, arrivent au contact même de la zone corticale. Souvent aussi, une couche de cellules mésenchymateuses sépare les deux parties.

Tantôt le cortex bourré de nids à ovocytes forme un revêtement continu et épais à la surface du testicule (fig. 14, 15, Pl. XIII), tantôt il fait saillie à une extrémité de cet organe. Il est peu étendu mais épais et présente de profondes échancrures (fig. 16, Pl. XIII). Celles-ci rappellent en tous points les formations que nous avons observées chez des femelles soumises à l'action des rayons X, dans des conditions analogues (fig. 7, Pl. XI).

Enfin chez d'autres embryons, un épithélium germinatif épais et un cortex très mince revêtent une faible partie de la glande génitale gauche. C'est le cas de l'embryon n° 446 (fig. 17, Pl. XIII).

Parmi les intersexués qui viennent d'être cités, quelques-uns présentent un canal de Müller du côté gauche ou bien des tronçons d'oviducte.

Au 3° groupe appartiennent les embryons n° 326, 327, 465, 456, 375, 311.

La gonade gauche, comme celle de droite, est un testicule. Mais on reconnaît en de nombreux endroits, un épaississement de l'épithélium germinatif à cellules hautes et cylindriques. Celui-ci se détache et s'invagine vers l'intérieur de la glande. Un tube testiculaire se met souvent en contact avec cet épithélium (fig. 18, Pl. XIII).

Les conduits génitaux sont absents dans un cas (465). Chez les autres sujets, ils sont présents et plus ou moins bien développés.

D'après les différents types que nous venons de décrire, on peut donc distinguer 3 degrés d'intersexualité :

1) Dans le cas le plus accentué de féminisation, on observe un épithélium germinatif épais, un cortex stérile ou renfermant des ovocytes. Une zone de lacunes sépare le cortex de la médullaire pourvue de tubes testiculaires.

2) Chez d'autres intersexués, le système lacunaire est absent, mais le cortex au contact de la médullaire est encore bien développé.

3) Enfin dans les cas les plus faibles, le caractère d'intersexualité se réduit à un épaississement de l'épithélium germinatif qui s'invagine le plus souvent ; on voit également un ou deux tubes testiculaires se raccorder directement à cet épithélium.

Cette classification est dans l'ensemble approximative. Le caractère de féminisation est localisé, la partie non féminisée de la glande a tous les caractères d'un testicule authentique. D'autre part, le degré d'intersexualité varie d'une extrémité à l'autre de la glande génitale. Le cortex et la zone de lacunes, bien développés dans une région féminisée, sont réduits ailleurs à un cortex mince et discontinu.

5. — ETUDE DES EMBRYONS DE CANARD INTERSEXUÉS

La plupart des embryons de poulet intersexués, étudiés au cours de ce travail, présentent des modifications plus ou moins importantes du tractus génital. Les canaux de Müller se montrent en effet de bons tests pour étudier l'activité hormonale d'une gonade (Et. WOLFF, 1953).

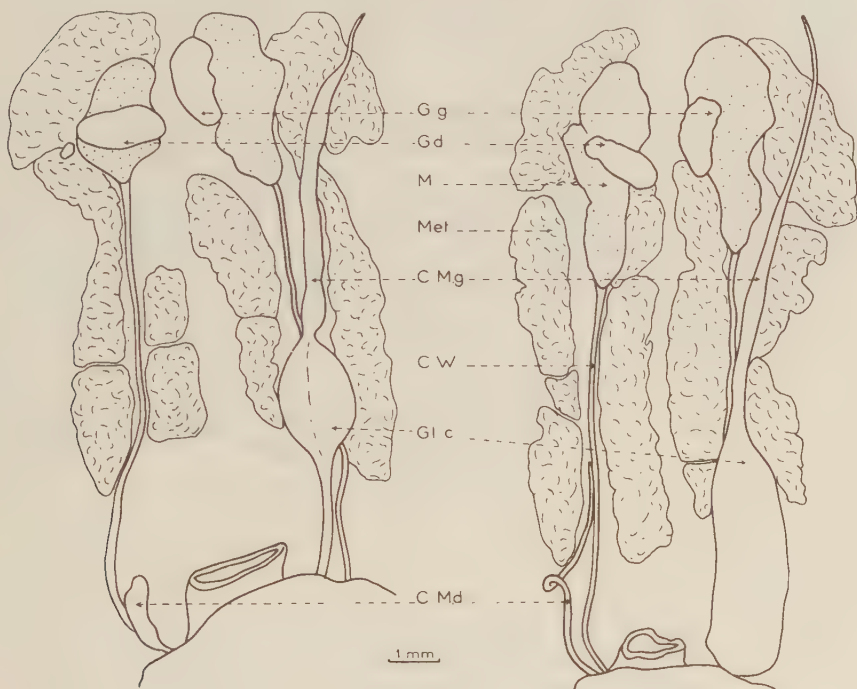


Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 4 et 5. — Aspect morphologique de l'appareil génital d'embryons de canard faiblement intersexués (21 jours d'incubation). Le tractus müllerien est bien développé. Les gonades de taille réduite ont l'aspect de testicules.

G.g., gonade gauche; G.d., gonade droite; C.M., canal de Müller (g. et d. : gauche et droit); Glc., glande coquillière; C.W., canal de Wolff; M., mésonephros; Met., métanephros.

Dans les cas les plus accentués de féminisation, les canaux de Müller sont intégralement conservés, le canal droit régressant parfois, comme chez une femelle. Or, on sait que d'autres caractères sexuels somatiques répondent à l'activité hormonale d'une gonade. Ce sont la syrinx et le tubercule génital de l'embryon de canard dont la différenciation a été étudiée en détail par Em. WOLFF (1950). Cet auteur a montré que l'évolution sexuelle des deux organes était étroitement liée à celle des gonades.

L'hormone femelle est particulièrement active dans la différenciation sexuelle; en l'absence d'hormone, (réalisée lors des expériences de castration), syrinx et tubercule génital évoluent vers le sexe mâle.

Au contraire, l'apport d'hormone femelle oriente la différenciation des deux caractères somatiques vers le type femelle. Suivant la quantité d'hormone ♀ présente chez l'embryon (cas des castrations partielles), Em. WOLFF obtient tous les types intermédiaires entre la morphologie mâle et la morphologie femelle.

Au cours de nos expériences, les embryons sont irradiés dans les mêmes conditions que les embryons de poulet : irradiation localisée suivie d'une



Fig. 6. — Structure de la gonade gauche d'un intersexué âgé de 22 jours.
Un fragment cortical vient se greffer sur le testicule.

(C., cortex; e.g., épithélium germinatif; t.t., tubes testiculaires.

irradiation totale, ou deux irradiations localisées séparées par un intervalle de 24 heures. Ces expériences ont pour but d'étudier le comportement de la syrinx et du tubercule génital des embryons intersexués obtenus par irradiation aux rayons X.

Comment réagissent syrinx et tubercule génital à une féminisation éventuelle des gonades? La réponse de ces deux organes pourrait nous renseigner s'il y a sécrétion d'une hormone femelle au cours des phénomènes d'irradiation responsable de la féminisation du testicule gauche.

Les canards sont autopsiés à un stade tardif du développement, peu avant l'éclosion, aux stades 19 à 21 jours. La régression complète des canaux de Müller ne s'effectue en effet qu'après le 15^e jour de l'incubation. Des résidus céphaliques peuvent même persister jusqu'à l'âge de 20 jours.

L'étude morphologique des organes sexuels de ces embryons révèle la présence de gonades normalement constituées, souvent réduites de taille par rap-

port à celle des témoins. Cependant, la plupart des mâles possèdent des canaux de Müller développés suivant toute leur longueur. Parfois même l'évolution de ces organes rappelle celle des canaux femelles : canal gauche normalement développé avec pavillon, trompe et glande coquillière, canal droit réduit à un mince filet débouchant dans le cloaque (fig. 4 et 5).

L'étude histologique portant sur 6 mâles révèle une structure testiculaire dans 3 cas. Les autres présentent une légère intersexualité : tantôt des expansions corticales font saillie à la surface du testicule ; ce sont des nids isolés renfermant des ovocytes ; ailleurs, on observe une petite crête irrégulière constituée par un épithélium et quelques bourgeons pourvus d'ovocytes (fig. 6). Ces formations sont beaucoup moins nettes que chez le poulet. Dans aucun cas, on n'aperçoit de cortex épais, continu, et des lacunes séparant la partie testiculaire de la zone corticale. La féminisation est discrète et reste localisée à certains endroits du testicule.

Cependant le but cherché n'a pas été atteint. Syrx et tubercule génital ont suivi dans tous les cas une évolution conforme au sexe génétique. On peut penser que l'intersexualité est trop faible, on ne peut donc conclure à la présence d'une hormone féminisante sécrétée par suite de l'irradiation des gonades.

6. — COMPARAISON DES RÉSULTATS AVEC LES INTERSEXUÉS OBTENUS PAR D'AUTRES MÉTHODES

Les intersexués obtenus par irradiation sont comparables à ceux qui sont réalisés par la méthode des injections d'hormone et des greffes d'ovaire.

Et. WOLFF et A. GINGLINGER (1935) ont montré que l'injection d'hormone femelle à des mâles génétiques, entre le 3^e et le 8^e jour de l'incubation détermine la féminisation plus ou moins intense de ces mâles. Ces derniers ont été classés suivant 4 degrés intermédiaires entre les mâles et les femelles. De la comparaison entre ces recherches et les expériences effectuées aux rayons X, il résulte que nos mâles les plus féminisés correspondent uniquement aux intersexués hormonaux des types I et II. La gonade gauche est transformée en ovotestis, le cortex est différencié, au moins dans une partie de la glande ; un canal de Müller ou des tronçons d'oviducte subsistent. Ce qui est digne de remarque, c'est que généralement les gonades ont une faible intersexualité (I, II) tandis que les canaux ont une forte intersexualité (III et IV).

Les intersexués faibles se rapprochent de ceux qu'ont obtenus Et. WOLFF et Em. WOLFF (1947) en injectant de fortes doses d'hormones à des embryons de 7 à 13 jours d'incubation ; de place en place, des fragments d'épithélium germinatif sont conservés ; dans les cas les plus faibles, des cordons testiculaires s'ouvrent à la surface de la glande génitale. Ces formations ont été également décrites par Et. WOLFF et A. HAMPÉ (1950).

Enfin l'injection d'hormone femelle à l'embryon de canard âgé de 5 à 9 jours provoque dans tous les cas un degré d'intersexualité gonadique faible (travaux de L. B. LEWIS (1946), Em. WOLFF (1950)).

Sous l'action des rayons X on obtient un effet identique : le testicule présente des signes de féminisation discrets et localisés. Au contraire, en ce qui

concerne les canaux de Müller, l'intersexualité est aussi prononcée que chez le poulet.

Les expériences de greffe de gonades embryonnaires réalisées par Et. WOLFF (1946-1947) ont montré que l'hôte manifeste des signes d'intersexualité, si le sexe du greffon est différent de celui de l'hôte. Les modifications des glandes et voies génitales sont moins importantes que les transformations obtenues dans certaines conditions par action hormonale. Les intersexués par irradiation ressemblent à ceux qu'on obtient par la méthode des greffes. Mais cette comparaison est uniquement valable pour les gonades. En effet, l'hôte mâle ayant reçu un greffon femelle ne présente jamais de conduits müllériens bien développés. Dans les deux cas : greffe et irradiation, on retrouve les mêmes degrés d'intersexualité du testicule gauche. Les transformations provoquées par la technique d'irradiation et par les greffes sont moins intenses et plus localisées que celles qu'on obtient par les injections d'hormones cristallisées dans certaines conditions d'expérience.

Ces observations montrent qu'il y a une certaine similitude d'action entre les hormones et les rayons X. Il convient cependant de noter que l'action des rayons X est plus toxique que celle des hormones. Les rayons provoquent une mortalité importante et des malformations diverses chez l'embryon ; en outre, ils inhibent le développement des glandes génitales et les rendent sinon complètement, du moins partiellement stériles. Cet effet stérilisant s'observe parfois après une action hormonale. Ainsi R. K. BURNS (1950) injectant des doses élevées d'hormone femelle à de jeunes embryons d'opossum obtient des intersexués stériles.

E. — Evolution du tractus génital des mâles non intersexués.

Chez la plupart des embryons intersexués, les canaux de Müller persistent soit en entier, soit sous forme de rudiments. Or, on a constaté au cours de ces expériences, qu'un certain nombre d'embryons mâles, soumis aux mêmes conditions d'irradiation, conservent leurs canaux de Müller alors que l'étude histologique de leurs glandes génitales révèle une structure authentiquement testiculaire.

Ainsi, sur 27 embryons de poulet mâles traités par les rayons X : 16 sont intersexués, 9 sont mâles, mais possèdent des canaux de Müller, 2 sont des mâles normaux.

Chez le canard, on observe des anomalies identiques : sur 24 embryons mâles soumis à l'irradiation : 5 ont une morphologie mâle normale. Les 19 autres possèdent des canaux de Müller ou des rudiments de ces canaux.

Parmi ces derniers, 6 ont été soumis à l'étude histologique : 3 ont des testicules normaux, 3 sont faiblement intersexués.

Les anomalies du tractus müllérien sont plus ou moins marquées.

Dans les cas favorables, 7 canards et 1 poulet, le tractus génital, normalement constitué rappelle celui d'une femelle : le canal gauche est pourvu d'une glande coquillière bien développée, parfois légèrement hypertrophiée ; il présente pavillon et trompe à sa partie proximale. Le conduit droit est réduit

à sa partie distale. Chez d'autres sujets, 7 canards et 3 poulets, les deux canaux sont de même longueur. Enfin 9 embryons (4 canards et 5 poulets) ne présentent plus que des rudiments müllériens.

On peut se demander si une irradiation effectuée à un stade plus avancé du développement, entre 6 et 10 jours exerce encore une influence sur le maintien des conduits génitaux. A cet effet, quelques embryons sont irradiés en entier pendant 2 minutes (60 kV, 8 mA, 12 centimètres de distance). Un tel traitement effectué au stade de 6 jours puis réitéré à l'âge de 8 jours empêche la régression des canaux chez quelques sujets. La mortalité est élevée ; sur 16 irradiés, 6 seulement atteignent le stade de 16 et 19 jours. 4 ♂ ont des canaux de Müller développés suivant toute leur longueur. Des irradiations effectuées à un stade plus tardif (1^{re} irradiation à 7 et 8 jours) n'ont pas donné ces résultats. Il semble que le stade critique pour obtenir le maintien des conduits génitaux se situe avant le 7^e jour de l'incubation.

F. — Etude de l'action des rayons X sur les gonades explantées *in vitro*.

L'organe cultivé *in vitro* est soumis, à un stade déterminé de son développement, à l'action des rayons X. Ces expériences répondent à deux questions :

1) Peut-on obtenir des sujets intersexués après irradiation de gonades âgées de 6 à 10 jours d'incubation ? L'obtention de l'intersexualité en culture permettrait, en outre, d'effectuer une parabiose directe entre l'organe irradié et certains organes qui peuvent servir de tests de l'activité hormonale : syrinx, tubercule génital ou canaux de Müller.

2) On sait que la gonade femelle de poulet explantée se différencie en ovotestis pourvu d'un cortex normal et d'un noyau testiculaire typique (Et. WOLFF et K. HAFEN, 1952). La médullaire ne régresse pas. Or les expériences réalisées dans l'œuf ont montré que les rayons X pouvaient agir, d'une part sur les formations testiculaires du mâle, d'autre part sur la constitution des gonades femelles en accélérant la dégénérescence de la médullaire par formation de vastes lacunes. Il est vrai que, dans ce dernier cas, l'action n'est pas spécifique et tout l'ensemble cortex-médullaire est touché. Les rayons X ne pourraient-ils inhiber la structure testiculaire de l'ovotestis ?

L'atteinte primaire des rayons X sur les organes en culture porte essentiellement sur les éléments germinaux.

Des phénomènes d'intersexualité n'ont jamais été observés sur des testicules cultivés *in vitro*. Ce fait peut être attribué à la faible survie des organes prélevés avant la différenciation sexuelle et irradiés en culture ; il est en effet difficile de distinguer, après 3 ou 4 jours de culture, une femelle d'un intersexué éventuel.

Si l'exposition au rayonnement X se prolonge, la médullaire de l'ovotestis et le testicule sont touchés ; les structures testiculaires régressent, remplacées localement par une zone vacuolaire pyknotique ou simplement indifférenciée. L'ovotestis perd sa structure compacte mais n'acquiert cependant

pas les formations lacunaires d'un ovaire normal. On note seulement la disparition de noyaux qui font place à des vacuoles ou à des plages d'éléments nécrosés. Dans l'organe irradié *in situ*, un remaniement intense doit s'effectuer après irradiation ; les résidus provenant de l'atteinte par les rayons X sont éliminés. Par contre, dans l'organe cultivé *in vitro*, des noyaux pycnotiques et des zones de nécrose sont conservés. Dans le cortex, des formations vacuolaires remplacent les cellules germinales dégénérées.

Ces expériences montrent aussi que l'ovaire et le testicule isolés de l'organisme supportent des durées d'irradiation supérieures à celles qu'on peut imposer à l'embryon.

CHAPITRE IV

ACTION D'UNE TEMPÉRATURE ÉLEVÉE SUR LES ORGANES SEXUÉS

A. — Action d'une élévation de la température d'incubation sur les conduits génitaux.

STOLL (1948) a montré qu'une élévation de la température de la couveuse à 40°5 (la température normale est de 37°5 à 38°) provoque chez des embryons mâles la persistance des canaux de MÜLLER droit et gauche. Les embryons sont traités à partir de 2, 5, 7 ou 8 jours, jusqu'au stade de l'autopsie (14 à 20 jours).

Afin de limiter d'une façon plus précise les stades auxquels la température élevée maintient encore les canaux de MÜLLER, nous avons soumis les embryons de race Leghorn ou Sussex aux mêmes conditions d'élévation de température, mais pendant un temps très court, 2 ou 3 jours seulement.

Des travaux réalisés au laboratoire par Et. WOLFF (1949), Y. LUTZ-OSTERTAG (1954) et D. SCHEIB-PFLEGER (1955) ont montré que la régression des conduits génitaux chez l'embryon de poulet mâle s'effectuait entre le 7^e et le 10^e-11^e jour de l'incubation, et que cette régression était sous la dépendance de l'hormone mâle. Nous avons cherché à limiter l'intervention entre les stades 7 à 11 jours qui correspondent respectivement au début et à la fin de la régression.

Les résultats obtenus (Tableau II) montrent que la plupart des embryons soumis à 41° pendant 3 jours, du stade 7 au stade 10 jours, ou pendant 2 jours, du stade 8 à 10 jours, présentent des anomalies du tractus müllérien.

Les sujets ainsi traités sont autopsiés entre 15 et 20 jours ; à ce stade, il ne subsiste aucune trace de canaux de MÜLLER chez les mâles témoins. Les anomalies observées peuvent être divisées en trois groupes :

a) Les deux canaux, droit et gauche, persistent sur toute leur longueur et sont bien développés. Dans certains cas, le canal droit est régressé.

b) Les canaux sont entiers, mais leur calibre est mince. Ils sont filiformes, parfois renflés à la partie proximale.

c) Il ne reste que des tronçons de canaux, petits résidus localisés : trompe à la partie proximale, mince filet à la partie distale.

TABLEAU II

Incubation à 41° des embryons âgés de 7 à 11 jours.

Stade d'incubation à 41°	Nombre d'embryons opérés	Nombre d'embryons ♂ fixés après le 15 ^e jour	Normaux ♂	Caractères des canaux maintenus chez le ♂		
				a) ♂ à canaux bien développés	b) ♂ à canaux filiformes	c) ♂ à rudiments de canaux
7 j. → 10 j.	78	20	3	8	3	6
8 j. → 10 j.	32	14	4	8	—	2
9 j. → 11 j.	12	5	2			3

Une température élevée maintient donc chez le mâle le tractus müllerien, comme l'ont montré les travaux de STOLL. D'après nos expériences, il semble que le stade critique pour obtenir cet effet se situe entre 7 et 10 jours. Au delà de 10 jours, on peut encore observer quelques faibles rudiments mais jamais de canaux bien formés.

B. — Action d'une température élevée sur les gonades explantées *in vitro*.

On a vu au cours des expériences précédentes que la glande génitale était peu sensible à l'action d'une élévation de la température de la couveuse.

Comment évolue la glande cultivée *in vitro* et soumise directement à l'action de ce facteur ?

Les gonades mâles et femelles sont exposées à une température élevée, soit immédiatement, soit 6 heures ou 24 heures après la mise en culture. La température de 43° se montre nocive ; après quelques heures de culture, la nécrose est complète. Les expériences ont été réalisées à la température de 41° ou 42° et les durées de séjour à cette température varient entre 3 et 6 jours. Les fixations ont lieu à la fin de l'expérience après 3, 4, 5 et 6 jours de culture.

L'évolution de 34 explants femelles et de 38 explants mâles a ainsi été suivie.

Parmi les ovaires : 4 évoluent normalement, 30 possèdent une structure aberrante, 27 d'entre eux présentent une inhibition corticale :

4 à cortex nécrosé, 23 à cortex partiellement stérile.

Parmi les testicules : 13 sont normaux, 7 sont complètement nécrosés, 18 ont un nombre réduit de gonocytes.

L'étude histologique révèle des anomalies dans la structure des deux organes.

L'ovaire présente une réduction importante du nombre de gonocytes dans le cortex et aussi une légère atteinte de la médullaire qui débute toujours du côté du hile. L'ébauche corticale est toujours distincte de la médullaire; elle est constituée essentiellement d'éléments somatiques inégalement répartis. La stérilisation totale est rare (2 ou 3 cas seulement). La plupart des ovaires traités à une température élevée montrent une atteinte partielle de la région corticale. La gonade prend un aspect étiré, des foyers gonocytaires sont bien visibles localement, aux endroits où le cortex se trouve en contact avec le milieu. La bande corticale, réduite dans la partie médiane, renferme peu de gonocytes. Dans le cortex les noyaux en pycnose sont rares. Dans 4 cas seulement, ils envahissent, mêlés à des éléments sains, la zone corticale.

Ce tissu acquiert chez la plupart des explants une structure peu définie où les noyaux forment un ensemble peu dense, dû à la disparition d'éléments cellulaires. On y observe des amas nécrosés éosinophiles, des vacuoles et parfois des gonocytes aberrants réduits à une coque vide dépourvue de chromatine. Leur contour au lieu d'être sphérique est anguleux.

Ainsi une température normale d'incubation agit spécifiquement comme les rayons X sur les cellules germinales.

Mais la médullaire n'est pas épargnée. Dans un petit nombre de cas (5), elle évolue conformément à la médullaire de l'ovaire témoin. Dans les cas les plus nombreux, on observe, en même temps que la réduction du cortex, une atteinte plus ou moins importante de la médullaire qui affecte souvent la région du hile. Ici on aperçoit quelques noyaux en pycnose ou bien une zone vacuolaire peu différenciée. Une atteinte plus importante fait apparaître de nombreux noyaux dégénérés.

Une hausse de température agit donc à la fois sur le cortex et la médullaire; l'action reste néanmoins localisée aux gonocytes pour le cortex et la région du hile pour la médullaire.

Dans le cas du *testicule*, on observe tous les degrés de nécrose entre le type normal sain et le type complètement nécrosé. Le tissu sain qui persiste conserve sa structure testiculaire; la nécrose est localisée à des endroits très variés de la glande. Les noyaux sont souvent dépourvus de chromatine; le nombre de gonocytes présents dans les tubes testiculaires est réduit.

Cinq explants possèdent un épithélium développé sur une faible partie de la gonade et quelques tubes testiculaires débouchant à la surface de cette glande. Ces formations sont absentes chez le témoin. Il ne s'agit vraisemblablement pas d'un phénomène d'intersexualité, mais d'un retard de régression de ces structures.

Ces résultats mettent en évidence la sensibilité des gonades cultivées *in vitro* à l'action d'une température d'incubation supérieure à la normale. Celle-ci ne peut dépasser 41° pour les embryons soumis entièrement à ce facteur et 43° pour les glandes explantées *in vitro*. Les gonades des embryons traitées ne montrent aucune modification de structure. L'action d'une température élevée pendant 2 à 6 jours sur les organes sexuels cultivés *in vitro* se répercute de deux manières sur l'évolution de l'ovaire. D'une part, le cortex subit une inhibition importante, provoquée par la réduction du nombre de cellules germinales; d'autre part, la médullaire est touchée; de nombreux noyaux pycnotiques occupent la région du hile. La zone comprise entre le

cortex et la partie nécrosée du hile est toujours intacte, elle est constituée de tubes testiculaires typiques. Signalons néanmoins que, dans 5 cas, la médullaire est saine ; l'action a porté essentiellement sur la région corticale. Mais le résultat inverse a également été obtenu. Dans 3 cas, la médullaire est partiellement détruite, alors que le cortex renferme encore un nombre important de gonocytes. Tous les autres explants présentent une atteinte simultanée des 2 parties gonadiques.

Il est intéressant de constater qu'un facteur autre que les rayons X agit sur les gonocytes ; l'action est cependant moins spécifique que dans ce dernier cas. En ce qui concerne l'effet obtenu sur la médullaire, il est difficile de donner une interprétation. Cet effet est comparable à l'action nécrosante produite par l'asphyxie que l'on peut observer dans le cas d'un organe explanté à un stade tardif du développement. Il semble que la hausse de température pourrait agir dans le même sens, et provoquer l'asphyxie et la dégénérescence de la médullaire en inhibant certains processus métaboliques.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS

Les anomalies de l'appareil génital, observées chez l'embryon de poulet ou de canard, après action des rayons X ou d'une température élevée, se répartissent en 3 catégories :

1) Stérilisation partielle ou totale des glandes génitales.

2) Evolution aberrante de certains caractères somatiques des gonades.

a) La féminisation du testicule gauche sous l'action des rayons X, est l'effet le plus intéressant obtenu au cours de ces expériences.

b) Dans certains cas, on observe une inhibition du développement de l'ovaire : le cortex est réduit ; d'immenses lacunes occupent la médullaire.

3) Evolution anormale des conduits génitaux femelles (fig. 7).

a) Maintien des canaux de Müller chez l'embryon de poulet ou de canard mâle ; les gonades ne présentent aucun signe d'intersexualité.

b) Persistance du canal de Müller droit chez quelques embryons femelles.

1) En soumettant les embryons de poulet du 2^e au 6^e jour de l'incubation à l'action des rayons X, nous avons obtenu des sujets stériles. Ces expériences confirment celles de V. DANTCHAKOFF et de DULBECCO sur la stérilisation montrant que les rayons X, comme le rayonnement γ du radium, détruisent sélectivement les cellules germinales tout en respectant les tissus somatiques.

Des gonades stériles ou partiellement stériles ont également été obtenues après action directe des rayons X ou d'une élévation de température sur les glandes génitales cultivées *in vitro*.

2) Le résultat essentiel de ce travail est l'obtention d'embryons mâles intersexués. En exposant à l'action des rayons X des embryons âgés de 6 à 12 jours

d'incubation, V. DANTCHAKOFF avait obtenu des individus mâles et femelles. DULBECCO les soumettant au rayonnement du radium à un stade précoce (10 somites) pendant 24 heures croit constater que 14 embryons stériles, déve-

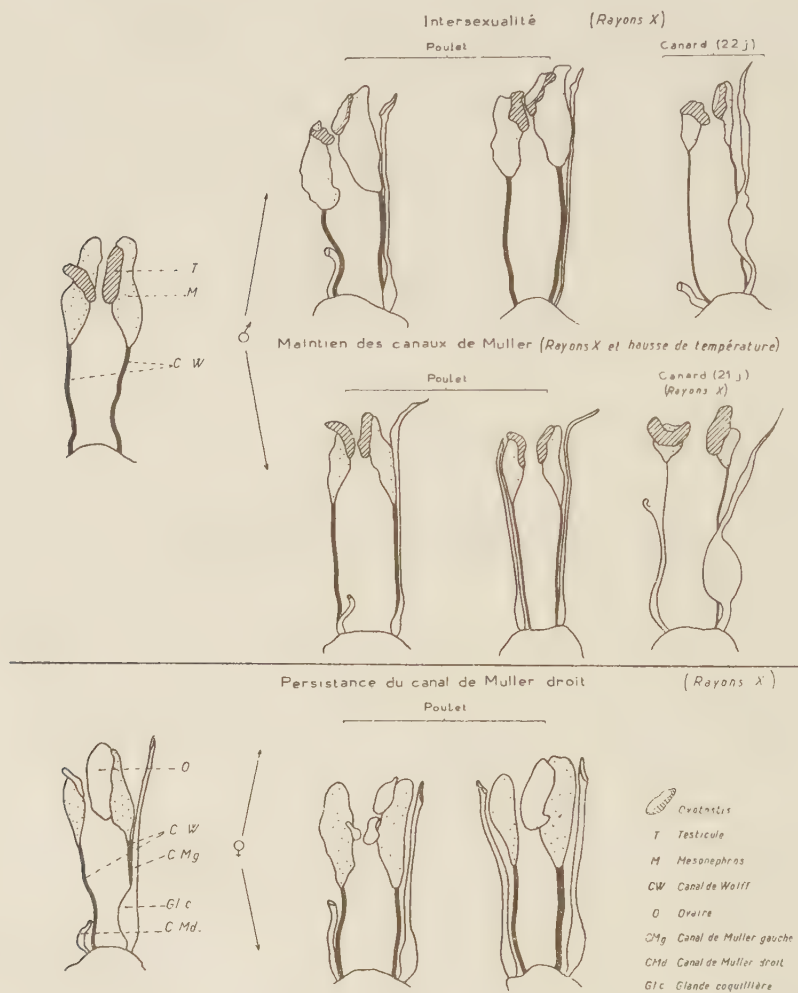


Fig. 7. — Tableau résumant l'action des facteurs physiques : rayons X et élévation de la température d'incubation sur l'appareil génital de l'embryon de poulet et de canard.

loppés au-delà du 10^e jour de l'incubation, sont tous de sexe femelle, et il pense avoir ainsi réalisé la transformation des sujets mâles en femelles. Dans certaines conditions d'expériences, après avoir donné des doses plus faibles, il s'aperçoit que la glande génitale gauche des mâles, autopsiés le 10^e jour de l'incubation, présente un arrêt de développement des cordons sexuels primai-

res ; ceci serait le signe d'un début de féminisation. Dans nos expériences, un grand nombre d'embryons mâles présentent nettement des caractères d'intersexualité qui affectent tantôt les gonades seules, tantôt les gonades et les conduits génitaux.

La gonade gauche est transformée en un ovotestis qui présente dans les cas les plus forts d'intersexualité une partie testiculaire au centre, et à la périphérie une zone corticale. Ces modifications des glandes et conduits génitaux sont très marquées à 15 jours d'incubation, stade auquel tous les embryons ont été autopsiés. Par contre, la plupart des embryons obtenus par DULBECCO ne dépassent pas le 10^e jour de l'incubation ; à ce stade, la différenciation sexuelle n'est pas encore très accusée ; il est alors difficile de distinguer les sujets femelles des mâles intersexués éventuels. On ne peut donc affirmer que les embryons mâles aient pu être transformés complètement en femelles.

Nous avons repris le travail de DULBECCO en modifiant cependant les conditions expérimentales. DULBECCO soumet les embryons à l'action du radium à un stade précoce (6 à 7 somites) et il prolonge cette irradiation pendant 24 heures. Nous avons procédé à des irradiations localisées aux rayons X, suivies, 24 heures ou 48 heures plus tard, d'une seconde irradiation totale. Nous avons ainsi obtenu 16 embryons mâles présentant des caractères d'intersexualité.

L'obtention de mâles intersexués prouve que l'irradiation a une action réelle sur la différenciation sexuelle. L'absence de cellules germinales n'exerce aucune influence, car les embryons stériles sont mâles, femelles ou intersexués. Il est également démontré que les rayons X n'ont aucune action nocive sélective sur les mâles.

Comment peut-on interpréter ces résultats ?

L'irradiation a lieu précocement, au moment où l'ébauche génitale n'est pas encore différenciée. Celle-ci a l'aspect d'un petit bourrelet faisant saillie du côté interne du corps de WOLFF. Génétiquement, nos intersexués sont des sujets mâles. Pour en avoir la preuve exacte, quelques expériences ont été effectuées sur des œufs provenant du croisement Rhode Island ♂ et Light Sussex ♀. Au stade de l'autopsie, on peut reconnaître le sexe génétique des embryons : les poussins mâles ont un duvet blanc, les femelles ont un duvet rouge.

Ces intersexués obtenus par irradiation ont les mêmes caractères que les sujets mâles féminisés par injection d'hormone ou greffe ovarienne ; on peut admettre que les rayons X causent une modification dans la sécrétion des hormones, ce qui entraîne la féminisation des individus mâles. Mais on ne peut encore dire quelle est la nature de cette sécrétion anormale.

Les recherches d'ANCEL et BOUIN (1904) ont montré que les hormones sexuelles n'étaient pas sécrétées par les cellules germinales, mais par des éléments spécialisés : les cellules interstitielles. Ce travail apporte un argument en faveur de cette théorie. En effet, l'absence de gonocytes ne modifie pas la sécrétion hormonale de l'embryon. On peut donc admettre que les rayons X lèsent les cellules somatiques de la gonade et inhibent ou dénaturent en partie la sécrétion de l'hormone mâle.

Deux hypothèses peuvent être envisagées :

a) Une déficience de la glande interstitielle du testicule provoque la sécré-

tion insuffisante de l'hormone mâle. Celle-ci ne peut empêcher la 2^e poussée des cordons sexuels secondaires et la persistance des conduits génitaux. On sait, en effet, d'après les travaux d'Et. WOLFF (1949), Y. LUTZ-OSTERTAG (1954) et D. SCHEIB-PFLEGER (1955), que l'hormone mâle est responsable de la disparition des canaux de Müller chez l'embryon mâle. Cependant une insuffisance de cette hormone ne permet pas d'expliquer l'intersexualité du testicule.

b) Sous l'effet des rayons X, l'hormone mâle subit une dénaturation. Une hormone femelle ou intermédiaire serait alors sécrétée, qui serait responsable de la féminisation du testicule et de l'évolution femelle des conduits génitaux. Le rayonnement, en provoquant des lésions nucléaires, agirait directement sur les cellules sécrétrices d'hormone.

3) Les conduits génitaux se sont montrés très sensibles à l'action des rayons X (fig. 7). La plupart des intersexués obtenus par irradiation possèdent des tronçons de canaux de Müller. On trouve néanmoins, dans ces mêmes séries expérimentales, des sujets mâles non intersexués possédant 2 canaux conservés en entier.

Notons que chez quelques femelles (7 sur 31) le canal droit n'a pas régressé ; il est anormalement long, mais n'atteint jamais la taille du canal gauche. Parfois il présente une petite glande coquillière.

Nous savons que d'autres facteurs physiques déterminent le maintien des canaux de Müller :

- incubation à basse température (WILLIER et YUH, 1928) ;
- incubation à haute température (STOLL, 1944 à 1948) ;
- action des ultra-sons (H. LUTZ et Y. LUTZ-OSTERTAG, 1956).

Nous avons repris les expériences de STOLL, en limitant le stade d'intervention à 2 ou 3 jours pendant la période critique de la différenciation sexuelle. Dans les deux cas, irradiation et hausse de température, les résultats sont identiques et présentent 3 degrés d'évolution :

- canaux normalement constitués (le droit régressant parfois comme chez une femelle) ;
- conduits génitaux filiformes ;
- résidus müllériens.

Ces deux derniers aspects macroscopiques des canaux font penser que la régression a effectivement débuté mais ne s'est pas réalisée complètement. Les gonades évoluent normalement ; chez les sujets irradiés, elles sont souvent de taille réduite, mais l'étude histologique ne révèle aucun signe de féminisation. Ces expériences montrent que l'augmentation de la température doit intervenir au début de la différenciation sexuelle des gonades et de la régression des canaux. Cette période se situe vers le 8^e jour de l'incubation.

Quels sont les facteurs responsables du maintien des canaux de Müller chez l'embryon du poulet ?

Les résultats obtenus par E. WOLFF et ses collaborateurs permettent d'envisager deux hypothèses :

1. Inhibition de la sécrétion hormonale des gonades.
2. Action directe des rayons X et de la température sur les canaux.

3. On sait que dans les conditions normales, l'hormone mâle est responsable de la régression des canaux de Müller. Les expériences de castration

réalisées par JOST (1946) chez les Mammifères, et par Et. WOLFF (1949) chez les Oiseaux, ont en effet montré que l'absence de gonades déterminait la conservation de ces canaux. Une insuffisance de la sécrétion d'hormone mâle, provoquée par les conditions défavorables, empêcherait leur régression. Il s'agirait là, selon l'expression d'Et. WOLFF (1950) d'une sorte de « castration physiologique ». Ces anomalies mülleriennes provoquées par la hausse de température et les rayons X rappellent celles d'embryons castrés. Dans les deux cas, on observe la persistance de 2 canaux entiers de même longueur et l'absence de glande coquillière.

Il convient cependant de remarquer qu'après action des rayons X, les canaux peuvent présenter une morphologie typiquement femelle, avec trompe, pavillon et glande coquillière. Cette évolution est fréquente chez l'embryon de canard, elle est plus rare chez le poulet.

Enfin, chez d'autres sujets traités par la température et les rayons X, le canal gauche maintenu en entier ne présente pas de glande coquillière, mais le canal droit a régressé comme chez une femelle normale.

Dans ces 2 cas, l'hypothèse d'une sécrétion insuffisante d'hormone mâle ne suffit pas pour expliquer l'évolution des canaux dans le sens ♀.

2. On peut envisager, comme 2^e hypothèse, une action directe de facteurs extérieurs sur les canaux.

L'étude de la régression biochimique des canaux de Müller effectuée par D. SCHEIB-PFLEGER (1955) montre que l'hormone mâle responsable de la régression des canaux provoque la nécrose de leurs tissus, puis active un système enzymatique qui doit digérer les tissus nécrosés. On peut penser que des facteurs extérieurs inactivent ou inhibent cet enzyme protéolytique, et empêchent ainsi la régression des canaux. Ce fait est confirmé par les travaux de H. LUTZ et Y. LUTZ-OSTERTAG (1956) relatifs à l'action des ultra-sons sur les canaux de Müller de l'embryon de poulet mâle; ces auteurs mettent en évidence l'action directe de ce facteur sur l'enzyme protéolytique.

Il est probable que dans le cas des rayons X, les 2 mécanismes interviennent, d'une part insuffisance d'hormone ♂ et d'autre part inactivation de l'enzyme protéolytique.

DEUXIÈME PARTIE

ACTION DE FACTEURS CHIMIQUES

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Nous avons vu au cours de la première partie de ce travail que certains facteurs physiques, reproduisant des effets hormonaux, perturbent le développement normal de l'appareil génital. Quelle est l'action de substances chimiques non hormonales sur les organes sexuels ? Peut-on obtenir des effets spécifiques sur certains constituants de ces organes ?

Pour effectuer une telle analyse chez l'embryon de poulet, on dispose de deux méthodes :

1^o Une méthode indirecte, celle de l'injection de substances tératogènes aux jeunes embryons, technique utilisée par P. ANCEL (1950) au cours de ses recherches de chimiotératogénèse.

2^o Une méthode directe, celle des cultures d'organes mise au point par E. WOLFF et K. HAFEN (1951). Elle permet d'explanter l'organe sexuel et de le soumettre à un certain stade de son développement, à l'action de facteurs tératogènes.

1) STOLL (1945, 1948), ANCEL (1950) observent des perturbations dans l'évolution du tractus génital de l'embryon de poulet ♀, après injection de diverses substances tératogènes : albucid, arrhénil, cacodylate de sodium, saponine, etc. (travaux de STOLL), sulfamides, arsenicaux et colchicine (travaux d'ANCEL). Chez tous les embryons ♀ traités à un stade précoce de leur développement, le canal de Müller droit, pourvu d'une glande coquillière, persiste.

Cependant, ces agents chimiques n'exercent aucune action sur les canaux de l'embryon mâle et sur les glandes génitales. On peut penser que l'embryon ne tolère pas les concentrations élevées qui seraient nécessaires pour agir sur les gonades.

2) Et. WOLFF et K. HAFEN (1952), explantant les organes sexuels de l'embryon de poulet sur un milieu de gélose, de tyrode et d'extraits embryonnaires constatent que l'ovaire évolue de façon aberrante. Il se transforme en ovotestis, à cortex typiquement ♀ et médullaire de caractère mâle ; les conditions particulières de la culture modifient l'évolution de l'ovaire. La cause de cette anomalie est encore inconnue. S'agit-il d'une perturbation métabolique, absence d'hormone ou déséquilibre nutritif ?

Je me suis adressée à la technique des cultures d'organes pour éprouver l'action de différents facteurs toxiques sur les glandes génitales de l'embryon de poulet. Certains tissus, sont-ils électivement sensibles à l'influence de substances tératogènes ?

DUSTIN (1929) injectant des poisons cellulaires à des rats, constate que certains poisons inhibent la division cellulaire et qu'une même substance peut agir sur certains organes et certains tissus à l'exclusion des autres. L'auteur désigne ce

dernier phénomène sous le nom de « sensibilité différentielle » d'un organe ou d'un tissu à une substance donnée.

DUSTIN et ses collaborateurs ont étudié un grand nombre de « poisons caryo-clasiques », substances qui agissent de préférence sur la chromatine nucléaire et qui provoquent ensuite une dégénérescence cellulaire. Certaines d'entre elles, la trypaflavine par exemple, exerce sur les noyaux une influence comparable à celle des rayons X, d'où le nom de radiomimétiques qu'on leur donne. Par leur action sur le noyau, les poisons nucléaires se répartissent en deux groupes :

- 1) les uns du type « trypaflavine » inhibent les divisions mitotiques, en empêchant le début de la prophase ;
- 2) les autres du type « colchicine » bloquent les mitoses au stade métaphase.

Ces substances antimitotiques ont peu d'action sur le cytoplasme. N. BROCK, H. DRUCKREY et H. HERKEN (1939), lors de leurs expériences sur les œufs d'oursin, distinguent les poisons nucléaires des poisons cytoplasmiques. Ils constatent que certains agents chimiques (colchicine) sont essentiellement des poisons du noyau, alors que d'autres (vératrine) produisent une inhibition considérable du métabolisme respiratoire avant d'agir sur le noyau. Entre ces deux cas limites, un certain nombre de substances (saponine, quinine) possèdent les deux actions.

La culture de tissus s'est révélée une voie de recherche fructueuse, pour étudier l'action directe de ces poisons sur les cellules et pour analyser le mécanisme intime de la division cellulaire. On agit sur des souches cellulaires pures : fibroblastes, cellules hépatiques, tissus nerveux, moelle osseuse, cellules cancéreuses.

LUDFORD (1936) fut un des premiers auteurs à étudier l'influence de facteurs chimiques : trypaflavine, colchicine, cacodylate et uréthane sur les cellules en culture. Ses recherches ont été le point de départ de nombreux travaux parmi lesquels nous citerons ceux de MÖLLENDORFF (1937-1938), BUCHER (1939-1940), LETTRÉ (1950), VERNE (1948), CHÈVREMONTE et FIRKET (1950-1951), POMERAT et WILLMER (1939), HUGHES (1950). LETTRÉ a donné une bibliographie détaillée de ces travaux. Toutes ces expériences, portant sur des cellules saines et cancéreuses, montrent que les substances toxiques les plus variées perturbent le déroulement normal de la mitose et agissent d'une manière spécifique sur certaines phases de la division cellulaire.

On a cherché à interpréter le mécanisme d'action de ces divers poisons. La plupart des auteurs voient dans l'action des poisons mitotiques, une inhibition des processus métaboliques de la cellule. BROCK, DRUCKREY et HERKEN (1939), étudiant l'action des poisons mitotiques par des méthodes physiologiques, signalent l'action spécifique de certaines substances sur le métabolisme respiratoire de l'œuf d'oursin. D'après MCLLWAIN (1941) et LETTRÉ (1949), la trypaflavine intervient dans le métabolisme des acides nucléiques. P. DUSTIN (1947) suggère que les poisons mitotiques pourraient agir comme des inhibiteurs d'enzymes.

POMERAT et WILLMER (1939), HUGHES (1950) étudient l'action de substances inhibitrices d'enzymes sur des cellules cultivées *in vitro*. Ils utilisent des fluorures, le malonate, l'uréthane, l'iodoacétate de sodium, les cyanures, etc., et constatent que ces poisons agissent de manière élective sur les différents stades de la mitose, action qui rappelle celle des substances antimitotiques. M. CHÈVREMONTE et H. FIRKET (1951) montrent l'action inhibitrice du béryllium sur la phosphatase alcaline nucléaire. Cet enzyme inhibé, la synthèse des acides désoxyribonucléiques ne peut avoir lieu et la mitose ne s'effectue pas.

La technique des cultures d'organes oriente les recherches vers l'étude de l'action directe des facteurs tératogènes sur un organe isolé de l'organisme. On peut ainsi étudier la sensibilité des différents tissus d'un même organe à certaines substances chimiques. Reprenant la classification de DUSTIN, nous avons éprouvé l'action de 2 poisons types : trypaflavine et colchicine sur des ovaires et testicules différenciés, explantés *in vitro* (B. SALZGEBER, 1953-1955).

Les deux séries de substances ont donné des effets nettement distincts ; les uns

intéressent la médullaire, les autres, le cortex ovarien. Ces résultats montrent « la sensibilité différentielle » des deux tissus de la gonade embryonnaire du poulet, à un même poison. Enfin un 3^e groupe de substances, représenté par la nicotine, poison cytoplasmique selon BUCHER, agit sur les 2 constituants gonadiques.

L'ensemble de ces travaux montre la variété des effets provoqués par les substances toxiques sur les organes, les tissus et les cellules cultivés *in vitro*. Ces résultats mettent en évidence la sensibilité élective de certains groupes cellulaires et de certaines phases de la mitose à l'action de différents facteurs.

CHAPITRE II

TECHNIQUES

Pour analyser l'action de substances tératogènes sur les glandes génitales de l'embryon de poulet, nous nous sommes adressés à deux techniques, celle des injections d'une part et celle des cultures d'organes d'autre part.

A. — Injection de substances toxiques.

Elle est réalisée suivant la méthode utilisée au laboratoire pour des injections d'hormones sexuelles (Et. WOLFF, 1936). Elle consiste à déposer sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet âgé de 6 jours — avant la différenciation sexuelle — une ou plusieurs gouttes de la solution qu'on désire expérimenter. En cas de toxicité élevée, la substance est injectée à faibles doses, à quelques heures d'intervalle.

B. — Cultures d'organes.

Pour éprouver l'action directe de facteurs physiques et chimiques, je me suis adressée à la technique des cultures d'organes mise au point par Et. WOLFF et K. HAFEN (1951). La technique a été décrite en détail par ces auteurs.

Rappelons que nous utilisons le milieu naturel constitué de :

- 8 volumes de gélose en préparation dans le liquide de Gey ;
- 3 volumes de solution de tyrode ;
- 3 volumes d'extraits embryonnaires de poulet (dilution 50 o/o).

Le volume total est d'environ $7/10$ de cm^3 .

L'organe sexué, mâle et femelle, prélevé sur des embryons de 9 à 10 jours, donc sexuellement différencié est coupé en 2 parties ; une moitié servira de témoin, l'autre partie sera soumise à l'action de la substance tératogène. L'expérience a montré que la section ne gênait guère le développement ulté-

rieur, la cicatrisation se fait rapidement même en présence d'une substance toxique.

3 types d'expériences ont été réalisés :

1° La substance en solution dans du tyrode ou de l'eau est déposée au contact immédiat de l'organe. Cette méthode nécessite l'emploi de solutions de faibles concentrations. Elle a été appliquée au début de nos expériences et dans quelques cas seulement : expériences portant sur la trypaflavine, la colchicine ou le cyanure de potassium. La présence d'un liquide trop abondant au contact direct de la gonade nuit à sa survie et à son bon développement, aussi, avons-nous préféré à cette méthode une autre technique.

2° La deuxième technique consiste à ajouter la substance tératogène en solution au milieu de culture. Des expériences effectuées avec une substance colorée, la trypaflavine par exemple, ont montré que la pénétration de cet agent chimique se fait rapidement. Après 6 à 7 heures de culture, on observe déjà une légère coloration de la glande sexuelle. Le volume de la solution introduite dans le milieu à l'aide d'une seringue est d'environ $3/200 \text{ cm}^3$, et les milieux témoins reçoivent une quantité égale de tyrode ou d'eau distillée. Différentes concentrations ont été éprouvées pour une même substance. Elles sont comprises entre les doses qui permettent l'évolution normale de la glande et celles qui provoquent la nécrose complète après 12 heures de culture. En général, les concentrations intéressantes sont voisines du seuil de toxicité. Les glandes génitales explantées sur ces milieux toxiques évoluent jusqu'au stade de fixation qui varie entre 3 et 6 jours.

Une variante de cette technique consiste à cultiver l'organe sur un milieu normal et de le repiquer 24 heures plus tard sur un autre renfermant le poison. La gonade est ainsi soumise à des concentrations plus élevées que dans le cas précédent ; l'utilisation de cette technique s'est révélée intéressante pour étudier l'action de substances très toxiques telles que la colchicine.

3° Un dispositif spécial conçu par mon maître, le Professeur E. WOLFF, permet d'éprouver les effets des gaz sur les organes explantés *in vitro*. Les glandes génitales sont cultivées pendant 24 heures dans des salières sur milieu standard puis sont transplantées sur un autre milieu de même constitution mais sur verre de montre. Celui-ci est placé dans un récipient sur lequel s'adapte un couvercle rodé. Le récipient est muni de deux tubulures pourvues de robinets. Afin de maintenir une humidité convenable et de réduire le volume de l'air à l'intérieur de ce dispositif, le récipient contient comme le montre le schéma de la figure 9 un fond de gélose qui arrive au niveau des orifices des tubulures et une couche d'ouate de cellulose humide sur laquelle repose le verre de montre.

Le récipient est relié d'une part à la bouteille de gaz (azote ou oxygène) par l'intermédiaire d'un barboteur B₁, et d'autre part à un barboteur B₂ placé à la sortie et qui permet de vérifier si le passage du gaz a lieu normalement. La figure 8 représente ce dispositif.

La pression du gaz qui passe dans le système est faible. Afin d'opérer dans les mêmes conditions, on compte le nombre de bulles formées dans le barbo-

teur. Ce chiffre ne dépasse pas 100 à 120 bulles par minute et la durée totale de passage du gaz est de 60 minutes

Pour éviter l'arrivée brutale du gaz sur les organes, une paroi métallique

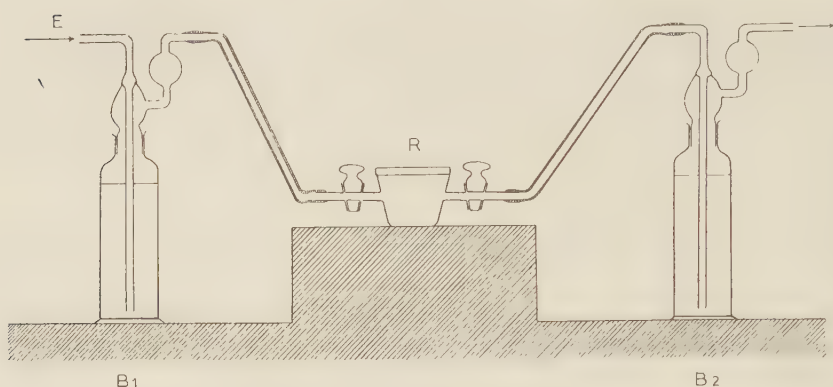


Fig. 8. — Schéma du dispositif utilisé pour les organes cultivés *in vitro*, soumis à l'action de l'azote. Vue d'ensemble; le gaz passe dans le barboteur B_1 , le récipient R et dans le barboteur B_2 . E. entrée du gaz.

mince d'aluminium est placée dans la gélose, à l'intérieur du récipient, en avant des orifices d'entrée et de sortie du gaz. Après passage du gaz, les

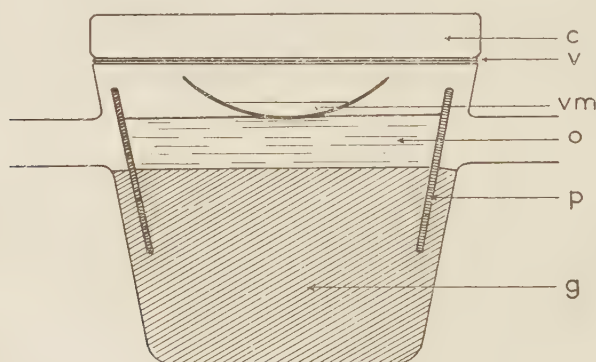


Fig. 9. — Détail du récipient R .

c., couvercle; v., couche de vaseline; v.m., verre de montre; o., ouate cellulosique; p., paroi métallique; g., gélose.

robinets sont fermés et les organes sont ainsi maintenus dans une atmosphère d'azote ou d'oxygène pendant 2 à 4 jours. Ils sont ensuite repiqués dans des silières où ils évoluent en atmosphère normale jusqu'au stade de la fixation.

C. — Classification des substances tératogènes utilisées au cours de ces expériences.

J'ai commencé ce travail par l'étude de l'action de deux poisons mitotiques types : la trypaflavine (chlorure de 3.6 diamino 10 méthylacridine), poison « préprophasique » et la colchicine, poison « métaphasique ».

Les agents toxiques utilisés par la suite se répartissent en deux catégories :

a) des poisons nucléaires qui par leur action antimitotique s'apparentent aux deux groupes précédents. Ce sont : le cacodylate de sodium (diméthylarsinate de sodium) ; le chlorhydrate de narcotine ; l'hydroquinone ; les sels d'ésérine et l'uréthane.

b) des poisons cytoplasmiques qui ne donnent pas de troubles mitotiques caractéristiques mais dont l'action s'exerce de préférence sur le cytoplasme. Ce sont la nicotine, la quinine et dans un petit nombre de cas : la vératrine et l'atropine.

Enfin au cours d'une 3^e série d'expériences, j'ai étudié les effets de facteurs inhibiteurs de métabolisme qui ralentissent ou inhibent en particulier l'activité respiratoire. A cet effet, les glandes génitales sont soumises à l'action du cyanure de potassium et à l'anaérobiose.

CHAPITRE III

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

L'injection de substances toxiques : trypaflavine, colchicine et narcotine à l'embryon dans l'œuf, entre le 6^e et le 9^e jour de l'incubation ne produit aucun effet sur les glandes génitales. Les concentrations utilisées dans ces expériences ont été respectivement de 28.10^{-3} milligramme pour la trypaflavine, 4.10^{-4} milligramme pour la colchicine et 1,19 mg. pour la narcotine. Ces doses sont voisines des doses de toxicité qui provoquent rapidement la mort du sujet injecté. On peut penser qu'une décomposition de la substance tératogène s'effectue dans le corps de l'embryon ou que les faibles concentrations n'atteignent pas la région des glandes génitales. Les concentrations élevées au contraire, toxiques pour l'embryon provoqueraient la mort de ces derniers avant que les glandes sexuelles ne soient atteintes.

La technique des « cultures d'organes » présente sur les injections l'avantage de pouvoir isoler la gonade et d'étudier les effets de substances tératogènes sur ce seul organe et non plus sur un ensemble aussi complexe que l'organisme. De plus, en éliminant le facteur vasculaire très sensible aux agents chimiques, elle permet l'administration de doses relativement élevées. Les chapitres suivants consacrés à l'analyse de l'action de substances antimitotiques et antimétaboliques sur l'ovaire et le testicule explantés *in vitro* apportent des résultats sur l'évolution morphologique et histologique de ces organes et sur la sensibilité élective des divers constituants envers les substances toxiques.

A. — Développement des glandes génitales.

I — ÉTUDE DES GLANDES GÉNITALES AU STADE DU PRÉLÈVEMENT :

9 A 10 JOURS

A 9 et 10 jours, stades du prélèvement des gonades, l'ovaire gauche a l'aspect d'une large bandelette aplatie alors que la gonade droite est en voie de régression. L'étude histologique de la glande femelle révèle la présence d'un épithélium superficiel, d'épaisseur inégale, constitué de cellules cylindriques. Par endroits, il se forme à partir de cet épithélium de véritables renflements qui font saillie vers l'intérieur de la glande. Ce sont les bourgeons corticaux dans lesquels on aperçoit des cellules globuleuses à gros noyaux arrondis qui sont des gonocytes. Ces bourgeons d'abord isolés s'accroissent rapidement et forment un cordon continu, bourré de cellules germinales. La zone sous-jacente à l'épithélium et à l'ébauche corticale renferme des cordons médullaires diffus dans lesquels on aperçoit de rares gonocytes et des noyaux en mitose.

Que deviennent ces cordons médullaires au cours du développement normal ? Jean FIRKET (1914) dans son mémoire *Organogénèse sexuelle chez les Oiseaux* décrit en détail l'évolution de ces cordons. Nous rappellerons quelques observations de cet auteur. L'évolution normale sera ensuite comparée à celle de l'ovaire cultivé *in vitro*.

A 7 jours, début de la différenciation sexuelle, la gonade est un ensemble compact, constitué de cordons testiculaires et d'un épithélium épais. Cette structure est valable pour le testicule et l'ovaire. Au cours du développement ultérieur, dans le cas de la gonade femelle, cet épithélium s'épaissit alors que les cordons formant d'abord un tissu massif et bien développé vont régresser par la suite. En effet, entre le 8^e et le 9^e jour de l'incubation, on voit apparaître dans cette zone médullaire un petit nombre de lacunes. Ce sont d'abord des fentes étroites et allongées occupant le centre du cordon. Elles sont petites, localisées surtout du côté du hile. Ces formations vont s'accroître ; les fentes s'élargissent irrégulièrement, fusionnant pour former du côté du hile un ensemble très vaste et lacuneux. A 9 et 10 jours, la médullaire forme encore un ensemble compact dans lequel les lacunes sont insignifiantes ; dans la partie profonde du tissu, on observe des cordons de lumière faible qui commencent à se creuser et dans lesquels on distingue des débris cellulaires légèrement colorés, des vacuoles, mais jamais de noyaux pycnotiques. Des cellules se détachent du tissu ambiant et sont peu à peu isolées dans ces lacunes. Celles-ci de dimensions plus vastes du côté du hile sont creuses pour la plupart. Parfois, on peut déceler un amas de gonocytes sains, isolés dans des cavités, dont la paroi est constituée de cellules aplaties.

A 13 jours, la zone médullaire occupe une grande partie de la glande sexuelle femelle. Cette augmentation de volume est en grande partie due au développement intense du système de lacunes qui forment un vaste réseau du côté du hile. Entre cette zone lacunaire et le cortex s'étend une région où les cordons sont pleins.

Ainsi, nous assistons à partir du stade de 9 jours à un développement considérable des bourgeons corticaux et à la dégénérescence progressive de la partie médullaire dont les cordons massifs et pleins disparaissent pour faire place à un système de lacunes de structure lâche. Cette évolution se poursuivra jusqu'à l'éclosion.

Comment est réalisée cette dégénérescence ?

FIRKET observe la présence de cellules spéciales : les leucocytes, qui provenant du mésenchyme situé en arrière du corps de WOLFF envahiraient la zone du hile, joueraient là un rôle phagocytaire et interviendraient dans le processus de dégénérescence des cordons médullaires ainsi que le souligne l'auteur. En outre, à partir de 13 jours, l'auteur signale la présence de nombreuses petites vacuoles dans un certain nombre de lacunes. Cette vacuolisation que nous avons également observée serait le signe d'une dégénérescence graisseuse des tissus.

Le testicule suit une évolution moins complexe. Les cordons testiculaires au lieu de régresser comme dans le cas de l'ovaire continuent d'évoluer. Au stade de 10 jours, ils sont nettement distincts les uns des autres. Ils sont limités par les cellules de Sertoli régulièrement disposées en bordure de ces tubes. Au centre, dans le tissu conjonctif évoluent des gonocytes isolés qui parfois viennent aussi s'insérer entre les cellules de Sertoli périphériques. Les tubes sont séparés par un tissu conjonctif, formé de noyaux allongés. Ultérieurement, la gonade mâle, tout en s'accroissant, conserve cette structure. Les tubes se creusent, à un stade plus tardif du développement. Enfin, à la périphérie, une enveloppe, l'albuginée constituée de cellules allongées et fusiformes est peu épaisse à 10 jours. Notons qu'à ce stade, du prélèvement de la gonade, il subsiste souvent un minuscule épithélium. Celui-ci représente un reste de l'épithélium germinatif que toute glande génitale possède au stade de l'indifférence sexuelle ; il évolue en s'épaississant chez la femelle, il régresse au contraire chez le mâle pour disparaître complètement vers l'âge de 10 à 11 jours.

2. — EVOLUTION DES ORGANES SEXUÉS EN CULTURE

L'évolution des glandes génitales prélevées au stade de 9 et 10 jours et cultivées *in vitro* pendant 5 à 6 jours, ayant été décrite en détail par Et. WOLFF et K. HAFEN (1952), je ne ferai que rappeler brièvement leur développement, en le comparant à celui de gonades non explantées.

Le testicule, cultivé *in vitro*, suit une évolution normale (fig. 20, Pl. XIV).

C'est un corps allongé, massif, d'aspect globuleux. L'étude histologique, après 5 à 6 jours de culture, révèle la présence de tubes testiculaires, renfermant des gonocytes et bordés de cellules de Sertoli typiques (fig. 21, 22, Pl. XIV). A la périphérie, s'étend une albuginée plus ou moins développée. Si la glande est explantée à un stade précoce, 8 jours par exemple, l'épithélium germinatif subsiste sous forme de rudiments.

A l'opposé du testicule, l'ovaire ne se différencie pas normalement.

Celui-ci en effet, prélevé à un stade indifférencié ou différencié, évolue de façon aberrante en ovotestis : le cortex est maintenu, la médullaire au lieu de

régresser conserve sa structure compacte et testiculaire. A l'aspect morphologique, la glande génitale femelle cultivée pendant 6 jours se présente sous forme d'une petite bandelette aplatie sur le milieu. Une frange transparente souvent lobée correspondant au cortex s'étale à la périphérie; ce caractère permet de reconnaître aisément, en culture, l'ovaire d'un testicule (fig. 23, Pl. XIV).

L'examen histologique confirme cet aspect morphologique des glandes. Le cortex volumineux est constitué d'un épithélium épais sous lequel se trouvent des nids à ovogonies. Des tubes testiculaires, tantôt bien développés, tantôt plus diffus, occupent la partie médullaire, lui conférant une structure compacte et massive. La figure 24, Pl. XIV, montre la section d'un ovaire de 9 jours cultivé pendant 4 jours; le volume occupé par la médullaire est nettement inférieur à celui d'une gonade normale, alors que le cortex est bien développé. Il n'y a jamais apparition de lacunes. La médullaire ne dégénère pas. Par ce caractère d'évolution aberrante, la gonade cultivée *in vitro* diffère d'une gonade femelle normale « non cultivée ». Ainsi les conditions spéciales de la culture, dues au milieu nutritif, à l'influence de facteurs extérieurs ou à l'insuffisance d'hormones, provoquent le maintien du constituant médullaire sous une forme testiculaire, alors que le cortex prolifère de façon intense.

B. — Action de substances tératogènes sur les gonades explantées *in vitro*.

Au cours de ces expériences, l'action de différentes substances a été éprouvée sur des organes sexués différenciés, qui dans les conditions normales de culture évoluent d'une part en testicules normaux, d'autre part en ovotestis. Les glandes génitales ainsi traitées montrent après plusieurs jours de culture des modifications morphologiques et histologiques qu'on peut grouper en 3 effets principaux. Ceux-ci sont dus, d'une part à la trypaflavine, d'autre part à la colchicine, l'hydroquinone, le cacodylate et la narcotine.

Un 3^e effet enfin est provoqué par la nicotine, la quinine, l'atropine et la vératrine.

L'action de ces différents agents sera étudiée en détail au cours des prochains chapitres.

I. — Poisons cellulaires.

Suivant la nature des poisons utilisés, on obtient des effets variés dont l'un est produit en particulier par la trypaflavine, l'autre par la colchicine et un troisième par la nicotine.

1. — EFFET TRYPAFLAVINE

Les solutions de trypaflavine ont été préparées dans le liquide physiologique de Tyrode à la concentration de 1 : 10.000 et 1 : 5.000. Une goutte de cette solution, soit environ 3/200 cm³, est ajoutée au milieu de culture. Cha-

cun reçoit ainsi une quantité de trypaflavine variant entre 1 et 3 $\mu\text{g.}$ pour 0,6 cm^3 de milieu.

Dans la plupart des expériences, les deux fragments gonadiques sont posés, après prélèvement, sur le milieu standard. 24 heures plus tard, l'un d'eux est repiqué sur le milieu renfermant la trypaflavine alors que le témoin continue d'évoluer sur milieu standard.

Dans quelques expériences, la gonade est explantée immédiatement après son prélèvement sur un milieu renfermant une dose faible de trypaflavine (concentration : 1/10.000).

La durée de la culture varie de 3 à 7 jours, les gonades sont alors fixées et soumises à l'étude histologique.

a) *Résultats expérimentaux.* — Au total 54 gonades provenant d'embryons mâles et femelles âgés de 9 à 10 jours ont été explantées.

5 explants subissent une nécrose complète après 24 heures de culture.

15 ovaires sur 23 et 19 testicules sur 26 présentent une évolution aberrante.

b) *Etude morphologique et histologique des gonades traitées par la trypaflavine.* — Des concentrations élevées, de l'ordre de 1/1.000, provoquent la nécrose rapide des explants dont les bords se hérissent et se désintègrent déjà quelques heures après la mise en culture. Les doses utilisées au cours de ces expériences permettent aux glandes génitales de poursuivre leur développement pendant 3 à 5 jours. A l'aspect extérieur, les gonades traitées par la substance toxique diffèrent peu des témoins. L'ovaire présente une épaisse frange corticale, lobée et transparente qui entoure une médullaire généralement compacte. Néanmoins, dans quelques cas, cette dernière paraît transparente.

L'examen histologique donne des indications plus précises et révèle des structures anormales dans les deux sexes.

L'ovaire comprend un épithélium germinatif épais, bien constitué, et des bourrelets corticaux riches en gonocytes. Cette structure rappelle celle d'un ovaire témoin, explanté dans les mêmes conditions, mais non traité par la trypaflavine. Il n'en est pas de même de l'autre constituant de l'ovaire, la médullaire, dont l'évolution est nettement atypique. On sait que cette dernière est normalement massive constituée de tubes testiculaires. Dans le cas des gonades femelles trypaflavinées, les cordons sont lâches, diffus, dissociés par des lacunes. Ces formations lacunaires sont plus ou moins développées. On peut ainsi distinguer plusieurs degrés d'inhibition :

1) Les glandes, les moins touchées par la substance toxique présentent un nombre réduit de petites lacunes localisées à la partie basale de la glande. Le tissu situé en arrière du cortex est compact, sans structure bien définie. Parfois il subsiste des vestiges de cordons testiculaires.

2) Dans la plupart des cas, le réseau lacunaire s'étend à toute la partie médullaire. D'importantes vésicules occupent la région du hile, des travées plus petites rayonnent vers la périphérie en dissociant ce tissu testiculaire. Les figures 26 (Pl. XIV) et 27 (Pl. XV) représentant les ovaires Tr 159 et Tr 163 sont des exemples de cette inhibition. L'une de ces gonades possède de vastes cavités du côté du hile dans lesquelles on voit évoluer des amas de gonocytes

TABLEAU I

Gonades femelles.

Les résultats sont portés dans le tableau suivant :

Stade d'explantation : 9 à 10 jours. Repiquage sur milieu à trypanflavine : 2/4 heures après la mise en culture. Dose par milieu de culture : 3 μ g. Nombre d'explants ♀ sains : 17 ; 13 d'entre eux ont une médullaire anormale et un cortex bien constitué.

N ^{os}	Stade d'explantation (en jours)	Durée de la culture (en jours)	Histologie
Tr 127	10	5	Système lacunaire bien développé.
Tr 129	10	7	Structure du tissu médullaire lâche, peu de lacunes.
Tr 133	10	4	Nombreuses lacunes.
Tr 134	10	4 1/2	Médullaire compacte. Histologie de la médullaire conforme à celle du témoin.
Tr 135	10	4 1/2	Médullaire parcourue de nombreuses lacunes.
Tr 136	10	6	Lacunes nombreuses.
Tr 141	10	5 1/2	Médullaire réduite, à nombreuses lacunes. Présence de noyaux en pycnose. >
Tr 142	10	5 1/2	Infiltration de petites lacunes dans la médullaire.
Tr 143	10	4	Une série de lacunes sépare le cortex de la médullaire.
Tr 146	8	5 1/2	Destruction d'une partie de la médullaire. Noyaux en pycnose.
Tr 154	9 1/2	4	Système lacunaire très développé.
Tr 153	9 1/2	4	Médullaire conforme à celle du témoin.
Tr 159	9 1/2	4	Système lacunaire très développé. Petites lacunes s'infiltrant entre les cordons.
Tr 160	9 1/2	4	Grandes lacunes du côté du hile. × ×
Tr 162	9 1/2	4	Médullaire de structure massive.
Tr 163	9 1/2	4	Infiltration de lacunes entre les cordons. × ×
Tr 168	9 1/2	4	Médullaire compacte.

Note. — Les croix indiquent le degré de lacunisation.

TABLEAU II
Gonades femelles.

Stades d'explantation : 9 à 10 jours. Pas de repiquage. Dose par milieu de culture : 1 à 2 μ g. Nombre d'explants ♀ sains : 6, 2 d'entre eux ont une médullaire anormale.

Nos	Stade d'explantation (en jours)	Durée de la culture (en jours)	Histologie
Tr 112	9	3 1/2	Structure massive.
Tr 116	9	3 1/2	Nombreuses lacunes.
Tr 119	10	7	Structure massive, non testiculaire.
Tr 125	10	7	Médullaire massive. Présence de tubes testiculaires.
Tr 126	10	7	Médullaire compacte. Présence de petites lacunes.
Tr 152	8	4 1/2	Réseau lacunaire nettement développé.

sains. Chez l'autre, de petites lacunes occupent la médullaire, enlevant à celle-ci tout caractère testiculaire. La figure 28, Pl. XV, montre un détail de cette zone; nous y observons de petites lacunes bien formées dont certaines renferment des débris cellulaires; par ailleurs le tissu dégénère, les noyaux disparaissent et font place à une zone de vacuoles.

3) Dans les cas extrêmes, de vastes lacunes envahissent la médullaire. Celle-ci vouée à la dégénérescence est très réduite

Chez la plupart des ovaires traités par la trypaflavine, cette inhibition de la médullaire n'est pas une nécrose. Dans l'ensemble, les tissus sont sains, ils ne contiennent que de très rares noyaux pycnotiques isolés. Les cellules germinales subsistant au centre de ces cavités sont normales. Il peut arriver qu'au cours de l'explantation, un peu de mésonephros soit entraîné avec la glande génitale : il s'associe étroitement à cette dernière. Or les gonades à système lacunaire possèdent souvent 1 ou 2 tubes mésonephritiques qui paraissent suspendus dans une cavité du côté du hile. Ce tissu est parfaitement sain. La pycnose est rare. Néanmoins, dans deux cas de formations lacunaires très poussées, des noyaux évoluant vers le stade pycnotique s'associent à cette dégénérescence du tissu.

Enfin, signalons l'absence de lacunes dans la médullaire de certains ovaires soumis aux mêmes conditions expérimentales. Ce tissu reste compact,

TABLEAU III. — *Première série d'expériences.*
Gonades mâles.

N ^{os}	Stade d'explantation (en jours)	Durée de la culture (en jours)	Histologie
Tr 123	0	5	Formations lacunaires. >
Tr 137	10	4 1/2	Normal.
Tr 138	10	4 1/2	Quelques petites lacunes. ×
Tr 144	10	4	Lacunes irrégulièrement réparties dans la gonade. × >
Tr 145	10	5 1/2	Lacunes à l'extrémité de la glande. Présence de noyaux pycnotiques. ×
Tr 155	9 1/2	3	Lacunes nombreuses. ×
Tr 156	9 1/2	3	Normal.
Tr 157	9 1/2	5	Destruction partielle de la gonade. × ×
Tr 158	9 1/2	7	Nombreuses lacunes. × ×
Tr 161	9 1/2	4	Lacunes localisées à l'extrémité de la gonade. ×
Tr 164	9 1/2	4	Petit nombre de lacunes. ×
Tr 165	9 1/2	4	Normal.
Tr 166	9 1/2	4	Système de lacunes partage la gonade en deux parties. ×
Tr 167	9 1/2	4	Lacunes à la périphérie. >
Tr 169	9 1/2	5	Normal.
Tr 170	9 1/2	5	Lacunes et noyaux pycnotiques >

TABLEAU IV. — *Deuxième série d'expériences.*
Gonades mâles.

Nos	Stade d'explantation (en jours)	Durée de la culture (en jours)	Histologie
Tr 111	9	3 1/2	Lacunes insignifiantes, nécroses.
Tr 113	9	3 1/2	Structure indifférenciée, absence de lacunes.
Tr 117	9	3 1/2	Absence d'organisation testiculaire, pycnoses.
Tr 118	9	3 1/2	Normal.
Tr 121	10	7	Structure vacuolaire.
Tr 122	10	7	Zone testiculaire décollée de la partie épithéliale par des lacunes. ×
Tr 147	10	4	Normal.
Tr 148	10	4	Système lacunaire très développé. × ×
Tr 149	10	4	Lacunes à la périphérie et au centre. × ×
Tr 150	10	4	Dissociation des tubes testiculaires par des lacunes. × ×
Tr 151	10	5 1/2	Zones de lacunes sous l'albuginée. ×

dépourvu de structure testiculaire ; de nombreux noyaux pycnotiques se mêlent aux éléments sains alors que le cortex reste indemne.

Dans tous les cas, quel que soit le mode d'inhibition de la médullaire, le cortex est épargné. Il évolue comme le cortex d'une gonade témoin. Même dans les cas d'inhibition les plus accentués, il subsiste un épithélium et des bourgeons corticaux, entre lesquels viennent s'insinuer de petites lacunes.

Aspect de la gonade mâle. — L'évolution est semblable à celle de la médullaire d'une gonade femelle traitée par la trypaflavine.

Première série d'expériences : dose de 3 µg par milieu de culture (après 24 heures d'évolution sur milieu standard). Sur 16 mâles, 12 présentent une évolution anormale (tableau III).

Deuxième série d'expériences : dose de 1 à 2 μg par milieu de culture. Sur 11 mâles, 9 ont un développement aberrant (tableau IV).

Le testicule traité avec la tryptaflavine se présente sous 2 aspects différents :

1) Dans certains cas, il est massif, dépourvu de toute organisation testiculaire ; de nombreux noyaux en pycnose sont mêlés aux éléments sains. Cette dégénérescence par pycnose est plus rare que l'inhibition par formation de lacunes.

2) La plupart des testicules subissent une destruction plus ou moins complète de leurs tissus. Tantôt de vastes lacunes, dans lesquelles on aperçoit encore des débris tissulaires sains, occupent une partie importante de la glande (fig. 32, Pl. XVI). Albuginée et tubes testiculaires sont réduits, cependant la membrane périphérique subsiste. Tantôt, les cavités sont petites et dissocient les cordons testiculaires. Parfois aussi elles restent localisées sous l'albuginée et de là s'infiltrant à l'intérieur de la glande.

Entin dans les cas les plus faibles, on observe seulement un léger décollement entre l'albuginée et le noyau testiculaire.

La plupart des tissus qui échappent à la destruction sont sains et riches en gonocytes. Les lacunes sont vides ou renferment des débris cellulaires en voie de digestion. Des noyaux en pycnose se mêlent parfois aux cellules saines ; quelques-uns envahissent aussi le système lacunaire. Ainsi sous l'action de la tryptaflavine, les formations testiculaires sont en partie supprimées, et remplacées par un réseau de lacunes.

Conclusions

De l'étude des glandes génitales traitées par la tryptaflavine, il ressort que des modifications très importantes affectent ovaires et testicules. Aux doses utilisées, cette action s'exerce d'une manière spécifique sur l'un des constituants gonadiques.

La médullaire de la glande femelle et une fraction du tissu testiculaire de la gonade mâle sont inhibées et sont remplacées par un système lacunaire plus ou moins développé. Par contre, le cortex ovarien ainsi que l'épithélium et une partie de l'albuginée testiculaire sont épargnés et subsistent au moins un certain temps.

Chez la femelle, cette inhibition est particulièrement intéressante. On sait que dans un ovaire normal, des formations lacunaires apparaissent dans la médullaire, dès le 10^e jour de l'incubation. Au contraire, l'ovaire cultivé *in vitro*, sur un milieu naturel devient un ovotestis dont la zone médullaire évolue en testicule. Après addition de tryptaflavine au milieu de culture, les cordons testiculaires régressent, des lacunes envahissent la médullaire. La gonade femelle est ainsi ramenée à une structure, qui rappelle dans une certaine mesure, celle d'une gonade normale. Les lacunes d'une gonade cultivée et traitée par la tryptaflavine sont-elles en tout point semblables à celles d'une gonade du même âge non explantée ?

Un examen détaillé des deux glandes génitales révèle à la fois une certaine analogie, et des différences très nettes dans l'évolution de ces lacunes. Dans

les deux cas, la médullaire envahie par un système lacunaire dégénère. (Fig. 25, Pl. XIV et 27, Pl. XV). Ces phénomènes dégénératifs débutent toujours du côté du hile, où nous observons de vastes vésicules souvent creuses et limitées par une assise cellulaire. A l'intérieur de ces cavités se trouve parfois un amas de gonocytes en voie de disparition (fig. 30, 31, Pl. XV). Dans la profondeur du tissu médullaire apparaissent de minuscules lacunes. Leur mode de formation, dont une description détaillée a été donnée au cours d'un précédent chapitre, est identique dans les deux ovaires ; apparition de fentes étroites au sein des cordons testiculaires, dilatation de ces tubes puis résorption des cellules se trouvant dans ces cavités. La figure 29, Pl. XV illustre ce phénomène de dégénérescence.

Néanmoins, à côté de cette similitude d'évolution des lacunes, des différences sensibles permettent de distinguer les deux types de médullaire. Dans le cas d'un organe femelle non explanté, les lacunes sont régulièrement disposées. Nombreuses et vastes du côté du hile, elles sont réduites dans la zone périphérique. Elles ont une forme allongée et s'étirent toutes dans la même direction qui est celle des cordons testiculaires, c'est-à-dire vers le hile. Elles semblent ainsi rayonner à partir de cette région vers les parties plus profondes du tissu. Cette disposition radiée se retrouve parfois chez la gonade traitée par la trypaflavine (fig. 27, Pl. XV). Dans la plupart des cas, des lacunes apparaissent non seulement dans les cordons mais elles s'infiltrèrent entre ces derniers en les dissociant. Tout l'ensemble du tissu est ainsi occupé par de nombreuses cavités de contours irréguliers. La structure de l'ovaire non cultivé paraît plus compacte que celle de l'ovaire soumis à l'action trypaflavine. Dans le 1^{er} cas, les lacunes sont isolées et confluent dans la zone du hile ; dans le 2^e cas, elles se rejoignent déjà en arrière du cortex et dissocient l'ensemble du tissu.

Ainsi, sous l'influence d'une substance toxique, la structure de l'ovotestis est ramenée à celle d'un ovaire. Il s'agit donc là, d'une action inhibitrice qui imite celle d'une hormone.

Le testicule suit une évolution analogue ; une partie des tubes testiculaires sont supprimés.

Dans tous les tissus non détruits, aussi bien dans la gonade mâle que dans la gonade femelle, les cellules germinales, qui sont généralement les constituants les plus sensibles de la glande, sont conservées. Ainsi la trypaflavine, considérée comme un agent radiomimétique, n'exerce pas comme les rayons X une action destructive sur les éléments germinaux. Par contre, les immenses lacunes, présentes dans la médullaire, rappellent celles qu'on obtient dans certains cas après action des rayons sur des jeunes embryons de poulet. Quelle est l'action intime de la trypaflavine sur les constituants cellulaires ? L'effet caryoclasique de cette substance a été signalé par de nombreux auteurs, parmi lesquels citons : DUSTIN A. P. (1929), LETTRÉ (1946), BUCHER (1939). La trypaflavine, selon DUSTIN empêcherait le début de la prophase ; elle agirait directement sur la chromatine. Selon BUCHER (1939) elle provoque la formation de ponts chromosomiques au moment de la séparation de 2 cellules-filles. De telles altérations chromosomiques n'ont pas été observées dans les gonades traitées avec la trypaflavine.

L'étude histochimique n'a pas été réalisée ; on ne peut savoir sur quel point

précis de la cellule, la substance agit. Nous avons néanmoins observé dans quelques cas des foyers de noyaux altérés. Ceux-ci sont très colorés, de teinte jaunâtre qui est celle de la substance; il est difficile d'y déceler une structure chromosomique.

Pour compléter ces données, sur l'action de la trypaflavine sur les glandes génitales cultivées *in vitro*, nous évoquerons quelques expériences réalisées sur la gonade femelle de l'embryon de canard. Le traitement est réalisé à un stade plus précoce, avant la différenciation sexuelle, vers l'âge de 7 à 8 jours et dans les mêmes conditions. On constate que le cortex poursuit son développement. Par contre la médullaire, celle-ci rappelons-le, régresse normalement chez le canard (Et. WOLFF et K. HAFEN (1951)), présente des signes de dégénérescence plus accentués que chez le témoin. Ceci montre donc que les gonades traitées à un stade précoce évoluent comme les organes soumis à l'action du poison après le stade de la différenciation sexuelle. La présence de trypaflavine dans le milieu n'empêche pas le cortex de poursuivre son développement. La substance tératogène agit seulement sur la médullaire.

Les expériences qui viennent d'être relatées montrent clairement que l'introduction de trypaflavine dans le milieu de culture détermine la régression de l'un des constituants de l'ovaire, la médullaire. D'autres substances toxiques sont-elles capables de produire le même effet tératogène? Poursuivant cette étude, je me suis d'abord adressée à un autre agent caryoclasique, la colchicine dont l'action antimitotique sur les métaphases est bien connue.

2. — EFFET COLCHICINE

Des expériences préliminaires effectuées avec la colchicine ont montré que cette substance est toxique et que des doses très faibles sont nécessaires pour assurer la survie des gonades. Les solutions sont réalisées dans le liquide de Tyrode ou l'eau distillée et les concentrations utilisées sont de : 1 : 100.000, 1 : 300.000, 1 : 500.000, 1 : 1 million, 1 : 2 millions. Chaque milieu de culture reçoit une dose comprise entre $1 \cdot 10^{-5}$ milligrammes et $20 \cdot 10^{-5}$ milligrammes. Dans la plupart des expériences, l'organe est cultivé sur un milieu normal; après 24 heures de culture, il est repiqué sur un milieu renfermant la solution de colchicine. L'évolution se poursuit ainsi jusqu'au stade de fixation qui a lieu 3 à 5 jours après explantation.

a) *Résultats.* — Une dose de $1 \cdot 10^{-5}$ milligramme de colchicine par milieu de culture fait apparaître quelques noyaux en pycnose dans les 6 ovaires. La différenciation sexuelle est normale dans tous les cas. Ce sont des ovotestis. Avec une dose de 2 à $20 \cdot 10^{-5}$ milligrammes on observe tous les degrés entre une décortication partielle et totale.

L'évolution anormale des glandes est caractérisée :

1) *Chez la femelle* par une exfoliation plus ou moins prononcée du cortex (40 cas); par l'apparition de nombreux noyaux arrêtés dans leur division mitotique et évoluant vers la pycnose. Ces noyaux aberrants envahissent aussi bien la médullaire que le cortex; par une atteinte secondaire de la médullaire qui au centre présente un important foyer de tissus nécrosés (19 cas).

TABLEAU V

Explants prélevés au stade de 9 jours à 10 jours et soumis à l'action de la colchicine pendant 3 à 4 jours. 69 explants ont été traités : 49 sont de sexe femelle ; 20 sont de sexe mâle.

Concentrations en milligrammes par milieu (0,6 cm ³)	Nombre d'explants	Evolution normale	Nécrose totale	Evolution anormale
20.10 ⁻⁵	3 ♀ 3 ♂			3 ♀ 3 ♂
5 à 7.10 ⁻⁵	6 ♀ 1 ♂		1 ♀	5 ♀ 1 ♂
3 à 4.10 ⁻⁵	26 ♀ 12 ♂	1 ♀	1 ♀ 5 ♂	24 ♀ 7 ♂
2.10 ⁻⁵	8 ♀ 4 ♂			8 ♀ 4 ♂
1.10 ⁻⁵	6 ♀	6 ♀		

2) *Chez le mâle* par l'inhibition partielle ou totale de la structure testiculaire et la présence de noyaux aberrants au sein de ces tissus.

b) *Etude morphologique.* — Après 24 heures de culture, la frange corticale de la glande femelle commence à s'effriter ; l'ovaire se contracte, devient globuleux et prend un aspect opaque. Le testicule, lui aussi, subit une atteinte partielle, il est massif peu transparent et présente une légère nécrose périphérique.

c) *Etude histologique.* — Elle confirme les données morphologiques. Ce qui frappe à première vue, c'est la forme arrondie de la section de l'ovaire qui ressemble davantage à celle d'un testicule qu'à celle d'un ovaire.

Evolution de la gonade femelle. — L'examen d'une coupe d'ovaire révèle une structure massive et compacte. Les deux constituants sont touchés mais l'atteinte porte essentiellement sur le cortex. Celui-ci est considérablement réduit. A peine visible dans certains cas (fig. 33, Pl. XVI), il est occupé par une importante zone de noyaux pycnotiques dans d'autres cas. La zone indifférenciée qui enveloppe l'ovaire est saine, constituée de noyaux allongés, fusiformes, formant un tissu dense. Des lambeaux de gonocytes sains ou en pycnoses s'en détachent (fig. 34, Pl. XVI). Parfois il subsiste du cortex une

faible partie renfermant des gonocytes isolés ou groupés en foyers minuscules. La surface de cette glande est hérissée de noyaux épars, en dégénérescence. Ainsi épithélium et cortex disparaissent, faisant place à une zone qui, par sa structure, se confond avec celle de la médullaire. Les gonocytes, isolés ou réunis par paquets qui jalonnent la surface de l'ovaire sont une preuve de l'action directe de la colchicine sur le constituant cortical qui se trouve dissocié.

L'autre constituant de l'organe femelle, la médullaire subit à son tour, quoiqu'à un degré moindre, l'influence de la substance tératogène. La structure de cette partie de l'ovaire est compacte, les noyaux sont denses, les formations testiculaires rares. L'ensemble prend un aspect indifférencié. Parmi les éléments sains, somatiques et germinaux, on observe de nombreux noyaux pycnotiques. Il ne s'agit pas là d'une pycnose banale, mais vraisemblablement de noyaux dont les divisions ont été bloquées au stade métaphase. Ces noyaux sont gonflés. Leur chromatine est condensée en un petit amas globuleux entouré d'une zone claire. De telles figures provoquées par la colchicine ont été signalées par différents auteurs : LITS F. J. (1936), LUDFORD R. J. (1936), BUCHER O. (1939), VERNE et VILTER (1940), LETTRÉ (1946).

Parfois de minuscules vacuoles dues à la disparition de ces noyaux apparaissent au sein de la médullaire.

Ces noyaux aberrants ne sont pas groupés, comme on pourrait le penser, du côté du hile, où la gonade se trouve en contact direct avec le milieu qui renferme la substance toxique mais ils sont disséminés, dans l'ensemble du tissu. Cette dégénérescence affecte indifféremment les cellules germinales et les cellules somatiques.

Enfin, dans un certain nombre de cas, nous avons observé la présence d'une zone de nécrose au centre de la gonade. Nous pensons qu'il s'agit là d'une asphyxie des tissus provoquée par la contraction de la glande dont les deux extrémités se rejoignent. L'observation morphologique montre en effet que l'ovaire en culture, traité par la colchicine ne reste pas étalé sur le milieu mais se contracte et prend un aspect globuleux. Les sections réalisées dans les régions extrêmes de la pièce ne présentent généralement pas de foyers de nécrose.

Evolution de la gonade mâle. — La même structure compacte décrite dans le cas de la médullaire femelle se voit dans le testicule. Le tissu est généralement sain dépourvu de toute organisation testiculaire typique. Les tubes, s'ils sont présents ont souvent un aspect désorganisé ; les cellules de Sertoli sont irrégulièrement disposées autour des tubes, certaines d'entre elles ayant dégénéré. Dans ces cordons aberrants, on aperçoit des noyaux gonflés en pycnose et des vacuoles. De nombreux gonocytes normaux sont visibles au sein des cordons diffus. La membrane périphérique et une partie de l'albuginée présentent aussi des signes de dégénérescence : nécrose localisée, présence de noyaux isolés à la surface de la glande. Ainsi, comme dans les expériences portant sur la trypaflavine, on observe chez la gonade traitée par la colchicine, une similitude frappante entre le développement de la médullaire ovarienne et celui du testicule.

Conclusions.

Contrairement à l'action tryptaflavine, la colchicine attaque le cortex qui se détache par petits fragments. Mais, l'autre constituant, la médullaire n'est pas épargné. L'action est donc moins élective que dans le cas tryptaflavine. La médullaire est toujours de structure compacte, et ne présente jamais de lacunes. Les formations testiculaires qui devraient normalement constituer ce tissu sont désorganisées, ce qui confère à l'ensemble un aspect indifférencié. Le testicule suit une évolution identique.

Dans les 3 tissus : médullaire, résidus corticaux et testicule, on retrouve ces noyaux gonflés renfermant un amas dense de chromatine. Ils proviennent de l'action du poison mitotique sur les noyaux en métaphase qui sont bloqués et qui évoluent par la suite vers la pycnose. On aperçoit de tels éléments « en métaphase » dans les gonades à différenciation sexuelle normale, qui ont été traitées avec des doses faibles. On les trouve dans le cortex et la médullaire. Dans les gonades, ayant reçu une dose plus élevée, ces noyaux nombreux ont des chromosomes agglomérés en un gros noyau pycnotique.

Mais l'action la plus importante de la colchicine porte sur la région corticale. Dans le cas où des fragments corticaux subsistent, des gonocytes sont conservés soit à l'état sain, soit à l'état de gros noyaux aberrants et vésiculeux.

On peut se demander si les cellules germinales sont électivement sensibles à l'action de la substance caryoclasique. Or les expériences montrent que les gonocytes évoluant dans le testicule et la médullaire ne sont pas électivement touchés par la substance tératogène. De nombreuses cellules germinales sont en effet mêlées aux éléments somatiques et la pycnose affecte les deux catégories de noyaux. Enfin dans le cortex on observe, d'une part la dissociation de l'ensemble cortical, d'autre part la présence de noyaux en pycnose. Cependant les gonocytes qui hérissent la surface de la glande ne sont généralement pas en dégénérescence. Ces faits démontrent que l'action antimitotique ne s'exerce pas seulement sur les éléments germinaux mais aussi sur les constituants somatiques de la glande. Il semble, qu'on ne peut attribuer la décortication à la seule action caryoclasique de la substance tératogène et qu'un autre mécanisme pourrait intervenir.

Les résultats de ces expériences m'ont incitée à rechercher et à étudier l'action d'autres substances tératogènes moins toxiques que la colchicine. Je me suis adressée à des poisons nucléaires qui, par leur action antimitotique, s'apparentent à la colchicine. Ce sont la narcotine, le cacodylate de sodium et l'hydroquinone.

Action du cacodylate de sodium.

La solution de cacodylate de sodium préparée à différentes concentrations s'échelonnant entre 1/50, 1/500, est ajoutée au milieu de culture. Chaque milieu correspondant à un volume d'environ 6/10 cm³ reçoit ainsi une dose pouvant varier entre 100 et 160 γ. Une concentration de 460 γ détermine la nécrose complète des organes, après quelques heures de culture, alors que la dose de 30 γ s'est révélée non tératogène.

Les explants sont portés immédiatement après leur prélèvement, les uns sur le milieu renfermant la substance toxique, les autres sur un milieu témoin. La fixation a lieu vers 3, 4 et 6 jours ; l'examen histologique permet de déceler dans ces organes traités un certain nombre d'anomalies que nous étudierons en détail.

a) *Résultats expérimentaux.* — Sur 52 explants soumis à l'action de la substance toxique : 17 sont de sexe mâle, 35 sont de sexe femelle. La plupart des organes (28) sont cultivés sur un milieu renfermant 120 à 130.10^{-3} milligramme de substance, 9 reçoivent 100.10^{-3} milligramme et les 5 autres 166.10^{-3} milligramme.

TABLEAU VI

Concentrations en gammas pour 6/10 cm ³ milieu	Répartition des sexes	Normaux	Nécrosés	Anomalies du cortex
100-115	5 ♀ 4 ♂	2 ♀ 3 ♂	1 ♂	3 ♀
120-130	19 ♀ 9 ♂	2 ♀ 8 ♂	2 ♀ 1 ♂	15 ♀
166	4 ♀ 1 ♂	1 ♂		4 ♀

22 gonades femelles ont un cortex aberrant. 2 sont nécrosées, médullaire et cortex sont atteints par la pycnose. 4 sont de structure normale.

Sur 14 gonades mâles explantées, 12 ont une structure testiculaire normale, 2 sont complètement nécrosées.

Quelle que soit la dose utilisée, on retrouve le même type d'anomalie dans les 3 séries. Avec la dernière concentration, on atteint néanmoins la limite de toxicité, les deux constituants de la gonade étant affectés.

b) *Examen morphologique des organes traités par le cacodylate de sodium.* — L'évolution de la glande mâle est en tout point identique à celle du témoin. Le testicule se présente sous l'aspect d'un boyau massif et transparent. Par contre, le développement de l'ovaire diffère sensiblement de celui du témoin. On sait que chez ce dernier, une minuscule frange transparente et lobée se dessine après 24 heures de culture. Cette frange ne cesse de s'accroître et à 3 jours, elle enveloppe toute la gonade. L'ovaire cultivé en présence de cacodylate de sodium présente une évolution un peu différente : le développement de la frange est inhibé. Tantôt elle n'apparaît pas, tantôt elle est nettement plus réduite que celle du témoin. Parfois, elle est présente, mais elle a perdu sa transparence, et se confond alors avec le noyau central de la glande.

c) *Etude microscopique de ces organes* (fig. 37 et 38, Pl. XVI). — La gonade mâle est constituée de tubes testiculaires typiques, même pour des doses qui se sont révélées toxiques pour l'ovaire. La gonade femelle, par contre, est sensible à l'action de la substance antiméiotique. En effet, l'étude histologique montre la disparition frappante du cortex confirmant ainsi la régression de la frange périphérique observée sur le matériel vivant. Dans la plupart des cas (22 ovaires sur 28), le cortex est atteint. Cette attaque se réalise à des degrés variés :

1. Une partie des ovaires traités par le cacodylate de sodium manifeste une inhibition importante de la région corticale, mais qui ne se traduit par aucune nécrose, ni exfoliation. La structure de la gonade femelle privée de cortex est ainsi ramenée aux formations testiculaires plus ou moins nettes de la médullaire. Celle-ci se confond avec la zone périphérique indifférenciée qui évolue à l'emplacement du cortex. Ici la présence de minuscules lacunes ou de quelques vacuoles atteste la disparition d'éléments cellulaires. Les gonocytes sont absents ou en nombre réduit, localisés par groupes de deux ou trois en différents endroits de la gonade. Parfois des cellules isolées se détachent de la surface de l'ovaire. Cependant les phénomènes de décortication intense observés chez les glandes traitées par la colchicine ne se retrouvent pas chez les organes cultivés en présence de cacodylate.

2. Une forme d'inhibition moins fréquente est la dégénérescence complète du cortex par voie pycnotique. La frange corticale est remplacée par une petite bande de noyaux bloqués en métaphase et évoluant vers la pycnose. Elle se détache par petits fragments de la médullaire saine, laquelle est constituée de tubes testiculaires petits et sains, non envahis de noyaux pycnotiques. Par place, on aperçoit des cellules germinales.

3. Dans le cas où l'inhibition est moins importante, la zone corticale est visible, distincte de la médullaire. Elle est néanmoins très réduite par rapport à celle du témoin. Elle peut être marquée par des foyers de gonocytes peu nombreux inégalement répartis ou par la présence d'une minuscule frange à la surface de la glande. Un tel rudiment cortical renferme parfois de gros noyaux gonflés dont la chromatine forme un amas compact. Il s'agit là, sans doute, de divisions bloquées au stade métaphase.

Quel est l'aspect de la médullaire de telles gonades privées totalement ou partiellement de cortex ?

Dans le plus grand nombre de cas (12 cas), elle est saine, formée de cordons testiculaires plus ou moins développés, diffus, de lumière faible. Les cellules germinales sont présentes dans ce constituant gonadique. Souvent celui-ci est envahi de noyaux aberrants, dont le petit nombre ne modifie guère la constitution générale de la médullaire. Dans quelques cas néanmoins, cette médullaire truffée de noyaux à mitoses bloquées et en pycnose, prend un aspect indifférencié. Enfin des noyaux en pycnose occupant la région du hile témoignent d'une toxicité accentuée.

Quelques ovaires (4 cas) présentent en outre des lacunes localisées du côté du hile de la glande. Il ne reste de la glande femelle qu'un tissu indifférencié sillonné de vastes vésicules, dans lesquelles on aperçoit des éléments pycnotiques.

Conclusions.

D'après ces expériences, le cacodylate de sodium agit d'une manière spécifique sur le constituant cortical de l'ovaire de poulet cultivé *in vitro*. Cet effet inhibiteur rappelle celui qui est exercé par la colchicine sur le même constituant ovarien. Rappelons que les deux substances possèdent le même pouvoir antimitotique : arrêt des divisions au stade métaphase. On observe en effet dans les gonades traitées par ces deux substances les mêmes images aberrantes : nombreux noyaux gonflés renfermant un bloc de chromatine. Ces éléments se retrouvent indifféremment dans les deux parties de l'organe.

L'action du cacodylate est cependant moins nocive que l'action colchicine. La gonade ne se contracte pas et reste aplatie sur le milieu. Enfin la section présente un aspect typiquement femelle, malgré l'inhibition du cortex ; signalons aussi l'absence de territoires exfoliés à la surface de la glande. La médullaire est saine, compacte, peu pycnotique, constituée de petits tubes peu différenciés. Quant au testicule, il suit une évolution normale.

Action de la narcotine.

La narcotine, employée sous forme de chlorhydrate en solution dans l'eau distillée, conc. 1/500 et 1/300, est ajoutée au milieu au moment de la mise en culture de l'organe. Les doses de substance tératogène pour une quantité de milieu de 6 à 7/10 de centimètre cube s'échelonnent ainsi entre 29 et 50 γ (29 à 50.10⁻³ mg.). Les organes évoluent sur ces milieux jusqu'au stade de la fixation qui a lieu vers 3, 4 et 6 jours après prélèvement de l'organe.

a) *Résultats.* — L'étude morphologique et histologique a été réalisée sur un total de 34 explants, dont 12 sont de sexe mâle et 22 de sexe femelle. Les résultats sont portés sur le tableau suivant :

Nombre d'explants de sexe femelle : 22 ;

Evolution normale : 2 ;

Anomalies de la gonade : 20. Inhibition complète du cortex : 7 ; atteinte partielle du cortex : 8 ; réduction du cortex avec de petits foyers de nécrose dans la médullaire : 5.

Nombre d'explants de sexe mâle : 12 ;

Evolution normale : 6.

Nécroses localisées à la périphérie : 5 ;

Nécrose complète : 1.

b) *Caractères morphologiques des gonades cultivées en présence de narcotine.* — Les gonades, prélevées au stade de 9 à 10 jours, évoluent pendant 3 à 6 jours sur le milieu de culture. Après 24 à 48 heures d'évolution, le développement du cortex d'une femelle traitée par la substance toxique diffère de celui d'une femelle normale. Au moment de sa fixation, le témoin femelle sain, âgé de 4 à 6 jours est pourvu d'une frange transparente, large et lobée qui représente le cortex. L'explant soumis à l'action du poison ne

possède au contraire qu'une petite frange rudimentaire à peine visible, jamais lobée. Le noyau central qui constitue la médullaire est transparent; dans quelques cas, il s'opacifie légèrement. Le testicule ne diffère guère du témoin.

c) *Caractères histologiques des gonades soumises à l'action du poison* (fig. 35 et 36, Pl. XVI). — L'anomalie la plus fréquente et qu'on observe dans presque tous les cas (20 cas sur 22) est l'inhibition complète ou partielle de la région corticale. Dans quelques cas, la médullaire est légèrement atteinte. L'attaque du cortex se manifeste de façon plus ou moins accentuée : cortex et épithélium germinatif ont régressé, faisant place à une zone indifférenciée constituée de noyaux somatiques et limitée par une membrane superficielle mince. La limite entre cortex et médullaire s'efface; de tels ovaires sont réduits à leur seul constituant médullaire. Dans les cas extrêmes, le cortex est absent. La plupart des gonades possèdent néanmoins un rudiment cortical. Au faible grossissement, on découvre souvent une zone très étroite, non différenciée, peu distincte de la zone médullaire. Elle ne renferme pas de gonocytes, les noyaux somatiques y sont irrégulièrement répartis, peu denses, séparés par des espaces vacuolaires (fig. 35, Pl. XVI). Ceux-ci proviennent vraisemblablement de la disparition d'éléments germinaux. Parfois le cortex, partiellement inhibé, contient localement des foyers de gonocytes généralement sains, rarement en état de métaphase bloquée.

Signalons enfin, que dans 2 cas, la région correspondant à l'épithélium germinatif et au cortex est occupée par de nombreux noyaux dont les divisions sont bloquées au stade métaphase. Ils forment une bande continue enveloppant la médullaire intacte.

La médullaire, chez la plupart des gonades traitées, offre un aspect sain : les formations testiculaires, bien que présentant souvent une structure peu définie, sont visibles. Ce constituant gonadique est en outre riche en noyaux dont les divisions sont bloquées au stade métaphase (fig. 35, Pl. XVI). Ceux-ci ne sont pas localisés du côté du hile ou du côté où la glande a été sectionnée, mais ils sont uniformément répartis dans l'ensemble de la gonade. Si la médullaire évolue dans de nombreux cas comme le témoin, il n'en est cependant pas toujours ainsi. Elle présente parfois de faibles signes de dégénérescence : petits îlots lacunaires localisés vers le hile et renfermant des noyaux en pycnose et des débris cellulaires.

La plupart des testicules traités par la substance tératogène sont sains et intacts. Ils ne diffèrent des témoins que par la présence de nombreuses figures métaphasiques au sein des cordons testiculaires. Parfois une légère nécrose affecte la membrane périphérique. Elle est cependant peu importante et reste localisée.

Conclusions.

De ces recherches, il ressort nettement, que le chlorhydrate de narcotine, poison mitotique comme la colchicine, exerce son action de préférence sur la région corticale. Le développement de celle-ci est inhibé : ses éléments germinaux dégénèrent partiellement ou totalement. Cette substance tératogène, nettement moins toxique que la colchicine, agit peu sur le constituant médul-

laire ou le testicule. Son action se rapproche de celle du cacodylate de soude.

Enfin pour terminer, nous mentionnerons les études effectuées avec un autre poison antimitotique : l'hydroquinone.

Action de l'hydroquinone.

La solution d'hydroquinone, préparée dans le Tyrode ou l'eau distillée, au moment de l'emploi, est ajoutée au milieu de culture. Les concentrations utilisées varient entre 1/4500 et 1/1800. Chaque milieu reçoit ainsi une dose comprise entre 3 et 12 γ ($3 \cdot 10^{-3}$ mg. et $12 \cdot 10^{-3}$ mg.). Les fixations ont lieu après 3 ou 6 jours de culture.

Au total 78 explants dont 57 ♀ et 21 ♂ ont été traités par la substance toxique.

TABLEAU VII

Concentrations utilisées par milieu en gammas	Nombre d'explants	Evolution aberrante non conforme au témoin	Nécrosés	Normaux
11 à 12	6 ♀ 4 ♂	5 2	1 2	— —
5 à 7	36 ♀ 7 ♂	17 —	8 7	11 —
4 à 5	12 ♀ 7 ♂	5 1	2 5	5 1
3	3 ♀ 3 ♂	— —	— —	3 3

De ce tableau se dégagent les résultats suivants : 19 ♀ évoluent comme les gonades témoins ; 11 sont nécrosés ; 27 ovaires présentent un développement aberrant.

a) *Observations morphologiques.* — Elles portent sur des gonades prélevées au stade de 9 à 10 jours, et évoluant pendant 1 à 6 jours sur un milieu de culture additionné d'hydroquinone. Après une vingtaine d'heures de culture, la gonade ♀ prend l'aspect d'un boyau légèrement opaque qui ressemble beaucoup à une glande traitée par la colchicine. Dans quelques cas, l'ovaire, explanté conserve néanmoins son aspect de languette, aplatie sur le milieu, mais dont la frange est nettement réduite. Le testicule se montre plus sensible que l'ovaire à l'action de la substance toxique. Des doses très faibles, seules permettent la survie de cet organe dont la différenciation s'effectue alors normalement.

b) *Etude histologique* (fig. 39 et 40, Pl. XVII). — L'examen histologique des glandes génitales femelles révèle des altérations importantes du cortex qui rappellent celles de sujets traités avec d'autres substances tératogènes.

27 ovaires sur 57 ont un cortex peu visible et peu distinct de la médullaire. L'observation de stades intermédiaires montre une désorganisation complète de la zone corticale. Des noyaux en dégénérescence et des vacuoles sont mêlés aux éléments sains. De nombreux organes fixés à 3 jours présentent, à l'emplacement du cortex, une zone indifférenciée qui se confond avec la médullaire (fig. 39, Pl. XVII). Souvent des fragments corticaux s'en détachent, ou bien des gonocytes isolés jalonnent la surface de la glande (fig. 40, Pl. XVII).

A côté de ces exemples d'inhibition complète de la région corticale, des régressions partielles n'affectent qu'une partie de la glande ; le cortex, absent ou très réduit dans la région médiane d'une coupe d'ovaire, est développé aux deux extrémités. Ce territoire, en contact avec le milieu et voisin du hile, renferme de nombreux gonocytes, alors que la zone moyenne du cortex en est dépourvue.

Ces expériences montrent que, sous l'action tératogène de l'hydroquinone, le cortex ovarien peut subir une atteinte plus ou moins sévère. Mais la médullaire est aussi légèrement touchée. Dans la plupart des cas, elle est constituée de tubes testiculaires peu différenciés, au sein desquels évoluent quelques gonocytes isolés. Cette structure, nous la retrouvons toujours quand l'examen histologique porte sur des sections effectuées aux 2 extrémités de la glande. Au centre de la pièce, l'aspect de la médullaire est néanmoins tout différent. Sous l'action de la substance toxique, la gonade se contracte, fait que nous avons déjà signalé chez des ovaires traités par la colchicine, les deux bords de la glande se rejoignent et s'accolent étroitement. Ce territoire est ensuite refoulé vers l'intérieur de la glande où il manifeste des signes de dégénérescence : tissu indifférencié, présence de petites vacuoles mêlées à de nombreux noyaux pycnotiques. Cette désorganisation est vraisemblablement due à un certain état d'asphyxie des tissus.

Notons que dans 7 cas, la médullaire de gonades possédant un rudiment cortical contient aussi des noyaux en pycnose parmi lesquels évoluent des gonocytes sains.

Conclusions.

L'hydroquinone exerce son action de préférence sur le cortex de l'ovaire et dans une certaine mesure aussi sur l'autre constituant gonadique, la médullaire. Le cortex est totalement ou partiellement inhibé. L'épithélium germinatif fait défaut. Des fragments corticaux, constitués d'éléments somatiques et germinaux font saillie à la surface de la gonade. L'effet obtenu avec ce poison mitotique est donc comparable à celui d'autres substances tératogènes étudiées : colchicine, narcotine et cacodylate. Cependant la gonade traitée par l'hydroquinone ne présente pas ces innombrables figures métaphasiques qu'on observe dans les organes soumis à l'action des autres corps toxiques.

Les signes de dégénérescence se manifestent surtout par la présence de tissus anormalement colorés par l'éosine, en voie de nécrose, et dans lesquels on aperçoit encore des noyaux sains.

3. — EFFET NICOTINE

Les solutions de nicotine sont réalisées dans l'eau distillée à différentes concentrations : 28/10.000, 35/10.000, 46/10.000, et 7/1.000. La substance est incorporée au milieu de culture et l'organe prélevé au stade de 9 à 10 jours est déposé sur ce milieu. Celui-ci renferme environ 0,05 à 0,16 mg. de poison.

Au total 76 explants ont été prélevés : 36 ♀ et 40 ♂. Les sujets sont répartis selon le tableau suivant :

TABLEAU VIII

Concentrations en gammas	Nombre d'explants ♀ et ♂	Normaux	Nécrosés	Nombre d'explants présentant une vacuolisation des gonades
50-60	10 ♀ 14 ♂	8 ♀ 11 ♂	— 1 ♂	2 ♀ 2 ♂
60-65	10 ♀ 11 ♂	— 1 ♂	1 ♀ 4 ♂	9 ♀ 6 ♂
80-93	9 ♀ 7 ♂	1 ♀ —	— 3 ♂	8 ♀ 4 ♂
105-116	5 ♀ 5 ♂	— —	1 ♀ —	4 ♀ 5 ♂
160	2 ♀ 3 ♂	— —	— —	2 ♀ 3 ♂

La plupart des glandes génitales ainsi traitées, soit 25 femelles et 20 mâles, présentent une évolution anormale. Celle-ci consiste en une vacuolisation plus ou moins prononcée des tissus qui affecte indifféremment le tissu testiculaire et le tissu ovarien.

a) *Résultats*. — Les formations vacuolaires sont plus ou moins bien développées :

- α) Système vacuaire peu développé. 1 ♀, 8 ♂
Vacuoles disséminées.
- β) Vacuoles moyennement développées 5 ♀, 7 ♂
Envahissent l'ensemble de la gonade.
- γ) Système vacuaire dans le cortex seulement 9 ♀
- δ) Vacuolisation complète des tissus. 10 ♀, 5 ♂
Structure indifférenciée.

L'effet vacuolisant complet a été obtenu avec des doses de 65 γ et 160 γ.

b) *Aspect morphologique des gonades.* — Celles-ci, prélevées au stade de 9 à 10 jours, sont cultivées pendant 3 à 6 jours. Après 24 heures de culture, on observe une légère opacité qui s'accroît les jours suivants. Les glandes génitales cultivées en présence de nicotine prennent une teinte blanc laiteux; elles ont un aspect hypertrophié, et semblent ainsi plus volumineuses que les glandes témoins. Le cortex est néanmoins bien marqué. Malgré cette apparence laiteuse, les glandes des deux sexes sont saines et évoluent normalement sans montrer des signes extérieurs de nécrose.

c) *Etude histologique des gonades* (fig. 41 et 42, Pl. XVII). — L'effet, qu'on observe dans tous les cas, consiste en une vacuolisation partielle ou totale des deux constituants gonadiques. La différenciation sexuelle est maintenue: testicule à tubes testiculaires typiques, ovaire constitué d'une médullaire et d'un cortex bien développé, bourré de gonocytes. Si l'atteinte est importante, les deux organes génitaux prennent un aspect identique, la différenciation sexuelle est alors peu visible. Dans la plupart des cas, les vacuoles sont inégalement réparties dans l'ensemble du tissu testiculaire et ovarien. La vacuolisation affecte en premier lieu le cytoplasme. On observe en effet des noyaux isolés, entourés d'une zone claire, de forme circulaire.

Puis ces noyaux d'abord sains, arrondis, sont déformés, deviennent anguleux et disparaissent à leur tour. Souvent 1 ou 2 noyaux subsistent au sein d'immenses vacuoles. Celles-ci d'abord petites et isolées, fusionnent par la suite pour former des espaces lacunaires plus ou moins développés.

Cette dégénérescence atteint indifféremment les cellules somatiques et les éléments germinaux.

Différents degrés de vacuolisation peuvent être obtenus. Mais ils ne sont pas toujours en rapport avec la quantité de substance incorporée au milieu de culture. La majorité des explants traités avec des doses de 50 à 60 γ par milieu évolue normalement. Avec des doses de 160 γ , la vacuolisation est complète, la différenciation sexuelle bien nette. Tous les tissus ont un aspect criblé dû à la présence de vacuoles parmi lesquelles sont disséminés des noyaux sains. Entre ces deux doses limites, tous les degrés de formations vacuolaires ont été obtenus; mais les concentrations les plus faibles ne donnent pas forcément les effets les moins accentués et réciproquement, on observe, dans les séries à forte dose, des vacuoles peu importantes.

Ces vacuoles proviennent de la fusion d'inclusions liquides intracellulaires. Celles-ci envahissent progressivement tout le cytoplasme; le noyau isolé au centre de ces enclaves reste vivant, du moins pendant un certain temps. Si les organes sont peu atteints, les vacuoles restent discrètes et isolées dans les deux constituants gonadiques. Mais si l'action toxique se prolonge, ces éléments à l'aspect de « trous » confluent et forment de grands espaces vides.

De telles images s'observent aussi bien dans le tissu testiculaire que le tissu ovarien (fig. 41, 42, Pl. XVII). Parfois, l'un des constituants est plus atteint que l'autre. Ainsi certaines gonades femelles présentent une médullaire normalement développée, alors que le cortex est occupé par un système vacuaire dense, dans lequel on aperçoit encore des cellules germinales (fig. 41, Pl. XVII).

Conclusions.

L'action de la nicotine s'exerce d'une manière constante sur les deux parties gonadiques femelles et sur la gonade mâle, en provoquant la vacuolisation plus ou moins prononcée des tissus. L'effet n'est pas spécifique (dans quelques cas seulement, le cortex s'est montré électivement sensible); le poison agit aussi bien sur la médullaire que sur le cortex, sur les cellules germinales et les éléments somatiques.

Ces expériences confirment les résultats obtenus par d'autres auteurs sur les fibroblastes cultivés *in vitro*. BUCHER (1940) étudiant l'action toxicologique de la nicotine observe une vacuolisation intense du cytoplasme cellulaire. VERNE (1948) signale une action analogue après traitement des cultures par l'atropine. Selon cet auteur, les vacuoles correspondraient à des enclaves lipidiques colorables au soudan. Ces enclaves d'abord discrètes, grossissent et exercent une pression sur le noyau qui se déforme et meurt.

Les expériences de VERNE m'ont incitée à étudier également l'action de l'atropine sur les gonades cultivées *in vitro*. Les doses de 60 à 120 γ par milieu de culture provoquent un effet « nicotine » typique, qui se traduit par une vacuolisation importante des tissus. Les effets tératogènes produits par ces deux substances sont donc comparables et on peut penser que la nicotine agit comme l'atropine en produisant une dégénérescence graisseuse du tissu.

Signalons enfin que la quinine et la vératrine, autres poisons cytoplasmiques, administrés sous forme de chlorhydrate de quinine et de sulfate d'atropine produisent un effet identique à celui de la nicotine. 38 explants (19 ♀ et 19 ♂) ont été soumis à l'action de la quinine, dont les concentrations par milieu de culture varient entre 45 et 75 γ : 10 gonades (4 ♀ et 6 ♂) ont été traitées avec l'atropine (conc. 30 et 60 γ). Les deux substances tératogènes produisent des effets analogues. L'évolution anormale des deux gonades est caractérisée par la présence d'un système de vacuoles qui envahit indifféremment le testicule et les 2 constituants ovariens. Cependant la vacuolisation est moins prononcée que dans le cas nicotine. Les vésicules isolées sont disséminées dans le cortex et la médullaire, mais ne fusionnent pas. Même en augmentant les doses, on n'obtient jamais de formations vacuolaires très étendues; par contre, les noyaux en pycnose apparaissent alors nombreux et viennent se mêler aux éléments sains, somatiques et germinaux. On observe en outre, chez de nombreuses femelles, une inhibition du développement de la région corticale. Celle-ci est réduite mais la bande résiduelle renferme de nombreux gonocytes. Enfin la présence d'images vacuolaires confère à la médullaire une structure peu définie non testiculaire.

Chez la glande mâle également, on aperçoit à l'intérieur des tubes testiculaires dont les limites sont bien tracées, un grand nombre de petites vacuoles vides ou renfermant des débris cellulaires.

Ainsi la quinine et la vératrine agissent comme la nicotine, mais à un degré moindre, sur les deux tissus gonadiques en provoquant leur vacuolisation.

II. — *Inhibitions respiratoires.*

Les expériences précédentes montrent que de nombreuses substances tératogènes perturbent le développement normal des glandes génitales cultivées *in vitro*. Les anomalies observées intéressent essentiellement la gonade femelle et se groupent en trois catégories :

Effet tryptaflavine caractérisé par l'inhibition de la médullaire, effet colchicine portant surtout sur le cortex, et effet nicotine qui provoque la vacuolisation plus ou moins étendue des deux constituants.

On peut envisager que ces différents toxiques ont perturbé des processus métaboliques. Or les phénomènes respiratoires jouent un rôle particulièrement important dans la croissance et la différenciation. Comment évoluent les glandes mâles et femelles cultivées *in vitro* et soumises à une carence en oxygène ou à l'action d'un inhibiteur respiratoire spécifique, le cyanure de potassium ?

I. — ACTION DU CYANURE DE POTASSIUM

Les solutions de cyanure de potassium préparées à des concentrations variant de $1/30.000$ à $1/5.000$ sont ajoutées au milieu de culture. Chaque milieu reçoit ainsi une dose de 2.10^{-4} milligramme à 37.10^{-4} milligramme pour $6/10\text{ cm}^3$ de milieu. Immédiatement après prélèvement, les explants sont cultivés sur ce milieu, puis ils sont fixés à différents stades du développement : 2 à 6 jours. Les doses produisant un effet sur l'évolution de la glande s'échelonnent entre 1.10^{-3} et 3.10^{-3} milligramme de KCN par milieu.

Sur 32 explants femelles : 7 présentent des anomalies qui intéressent uniquement la médullaire, 13 sont pourvus d'anomalies portant à la fois sur le cortex et la médullaire, 6 sont normaux, 6 sont nécrosés.

Sur 38 explants mâles : 15 ont une évolution normale, 17 sont nécrosés, 6 sont partiellement atteints.

Pour compléter ce travail, quelques expériences ont été réalisées en soumettant les organes (6 ♀ et 4 ♂) directement à l'action de la solution de KCN. A cet effet, 1 ou 2 gouttes de la solution sont déposées sur l'organe. Malgré le contact direct de la substance toxique, on constate que la sensibilité des organes n'est pas supérieure à celle des gonades cultivées sur un milieu renfermant le poison. La durée de culture en présence de cette solution peut même atteindre 4 à 5 jours, et les effets obtenus sont identiques à ceux qu'on observe dans les expériences précédentes.

Caractères morphologiques et histologiques des gonades cultivées en présence de KCN.

Par son aspect extérieur, la gonade femelle traitée par la substance toxique est peu différente de celle du témoin. Tantôt elle présente un aspect normal : cortex lobé et transparent, enveloppant une médullaire de structure compacte, tantôt cette dernière se confond avec la zone corticale, l'ensemble prenant un aspect granuleux peu différencié. Dans un 3^e cas enfin, la frange

transparente est nettement visible, mais l'autre constituant gonadique montre localement une petite zone d'opacité qui indique un début de nécrose. Le testicule, sain dans la plupart des cas, montre parfois des signes de dégénérescence se traduisant par une opacité locale ou un contour plus ou moins nécrosé.

L'étude histologique révèle chez la gonade femelle une structure plus ou moins aberrante du constituant médullaire. On observe une désorganisation importante de ce tissu où l'on trouve de nombreux noyaux en pycnose. Ceux-ci apparaissent isolés ou par petits groupes du côté du hile. La zone pycnotique peut s'étendre dans la profondeur du tissu, mais la région située immédiatement en arrière du cortex est toujours saine, constituée de tubes testiculaires ou d'éléments sans structure bien définie. Cependant le cortex n'est pas épargné; il est généralement sain mais petit par rapport au témoin. De nombreux gonocytes y évoluent, souvent dissociés par de petites vacuoles.

Le testicule présente de petits amas nécrotiques disséminés dans l'ensemble du tissu. Certains sujets sont normaux, d'autres sont complètement nécrosés.

Conclusions.

De l'étude de l'action du cyanure de potassium sur les ovaires et testicules cultivés *in vitro*, il résulte un effet peu spécifique qui porte à la fois sur la médullaire envahie de noyaux pycnotiques et sur le cortex qui subit une importante réduction. Mais celui-ci renferme toujours des gonocytes. On peut penser que la croissance de la zone corticale est empêchée, le cortex restant bloqué au stade du prélèvement et de la mise en culture de l'organe.

La médullaire subit dans tous les cas une nécrose importante, comparable à celle qu'on peut observer chez un organe cultivé à un stade tardif du développement et dont les tissus situés en profondeur sont voués à l'asphyxie, du fait de la trop grande épaisseur de la glande. L'effet obtenu rappelle en outre celui de l'azote. Mais tandis que l'action de ce gaz dans les conditions de culture normale porte essentiellement sur le constituant médullaire situé en arrière du cortex, la nécrose provoquée par le cyanure débute toujours à la base de la gonade, c'est-à-dire dans la région appliquée contre le milieu de culture. Les deux agents présentent donc une similitude d'action, les deux agissant de préférence sur la partie médullaire; le point d'attaque a lieu néanmoins en des endroits différents de cette zone. Enfin notons que l'action du KCN sur ce tissu est plus nuancée que celle de l'azote. Dans ce dernier cas, les résultats sont constants; dans le cas des cyanures, ils sont plus variables, la nécrose restant parfois localisée au mésonephros prélevé en même temps que la gonade.

2. — EVOLUTION DES GONADES EN PRESENCE D'AZOTE

Les organes sont soumis à l'action de l'azote pendant 24 à 48 heures. Des expériences préliminaires ont montré que l'anaérobiose de courte durée, inférieure à 24 heures, ne nuisait pas à l'évolution des organes. Par contre, la

nécrose complète se manifeste dans les gonades, lorsque celles-ci sont plus de 48 heures en présence d'azote. Nous avons fait varier la durée d'exposition en atmosphère gazeuse de 24 à 48 heures. Après ce temps de contact avec le gaz, les explants sont repiqués sur un nouveau milieu dans des conditions normales où ils évoluent jusqu'au stade de fixation : 4 jours et 6 jours après explantation des organes.

a) *Résultats expérimentaux :*

α) 8 explants (4 ♀ et 4 ♂) sont soumis à l'anaérobiose pendant 24 heures.

β) 20 explants (10 ♀ et 10 ♂) sont soumis à l'azote pendant 40 heures.

γ) 44 explants (21 ♀ et 23 ♂) sont soumis à l'azote pendant 48 heures.

La plupart des ovaires et testicules exposés à l'atmosphère d'azote présentent une évolution aberrante, alors que les témoins cultivés dans les mêmes conditions, mais en atmosphère normale sont indemnes. Les résultats sont portés dans le tableau IX.

Ce tableau montre que : sur 35 explants femelles : 28 ont une médullaire partiellement ou complètement nécrosée et un cortex normal. 3 présentent une médullaire nécrosée et une atteinte partielle du cortex, 2 sont nécrosés et 2 sont normaux.

Sur 37 explants mâles : 26 évoluent de façon aberrante, 9 sont complètement atteints et 2 sont normaux.

b) *Etude morphologique.* — Chez la femelle, on observe après 24 heures d'évolution, en présence d'azote, une légère opacité de la médullaire qui devient plus importante à mesure que se prolonge le temps de contact avec le gaz. Au moment du repiquage, qui a lieu après 40 ou 48 heures de contact, le centre de la gonade est devenu complètement opaque, alors qu'une frange transparente et lobée saine enveloppe la médullaire. Ce caractère opaque persiste encore pendant un certain temps, environ 24 heures après transplantation de l'ovaire, en atmosphère normale ; cependant, si la durée de culture se prolonge, on observe la régression de l'opacité et la médullaire prend un aspect transparent. Le testicule suit l'évolution de la médullaire femelle. Comme cette dernière, il devient opaque.

c) *Etude histologique.* — Elle confirme les observations morphologiques et révèle une atteinte plus ou moins sévère de la médullaire femelle et du testicule.

Evolution de la glande femelle. — Nos observations portent d'une part sur des ovaires soumis à l'azote pendant 24 à 48 heures et fixés après 24 heures d'évolution en atmosphère normale, d'autre part sur des organes soumis au gaz pendant le même temps, mais fixés seulement après 3 jours d'évolution en atmosphère normale.

1) Observation des gonades fixées 24 heures après le traitement à l'azote. Dans les cas où l'atteinte est faible, de petits foyers de noyaux pycnotiques apparaissent dans la médullaire, immédiatement en arrière du cortex. Quelques tubes testiculaires sont cependant bien conservés ; l'ensemble est peu compact, de structure peu nette. Des formations lacunaires se dessinent ; on y voit de nombreux noyaux en pycnose. Par ailleurs, on observe de minuscules vacuoles en voie de formation qui renferment 1 ou plusieurs noyaux en

TABLEAU IX

*Tableau concernant l'action d'une atmosphère d'azote
sur les glandes génitales mâles et femelles cultivées in vitro.*

Durée d'évolution en atmosphère azote	Nombre d'explants	Fixation 4 jours de culture	Fixation 6 jours de culture	Normaux	♀				♂	
					Anomalies de la médullaire	Médullaire nécrasée, Atteinte partielle du cortex	Nécrose complète	Atteinte partielle	Atteinte complète	
24 heures	4 ♀ 4 ♂	4 ♀ 4 ♂		2 ♀ 2 ♂	2	—	—	2		
40 heures	10 ♀ 10 ♂	5 ♀ 6 ♂	5 ♀ 4 ♂	— —	10	—	—	5	5	
48 heures	21 ♀ 23 ♂	17 ♀ 21 ♂	4 ♀ 2 ♂	— —	16	3	2	19	4	

dégénérescence. La figure 43, Pl. XVII, représente l'ovaire AZ 61 explanté à 10 jours et cultivé au contact de l'azote pendant 48 heures. Le tissu médullaire contient des zones de noyaux pycnotiques localisées dans la région médiane. Il est parcouru en outre par de nombreuses petites lacunes renfermant des éléments pycnotiques.

Le cortex offre un développement comparable à celui de l'ovaire témoin. Il est épais, bourré de nombreux nids à ovogonies.

Le témoin cultivé dans les mêmes conditions, mais en l'absence d'azote, montre une médullaire saine constituée par de petits tubes testiculaires.

L'atteinte est parfois très importante, et peut affecter la médullaire toute entière. Des noyaux en pycnose, très denses en arrière du cortex, moins nombreux du côté du hile, occupent l'ensemble de la zone médullaire. De petites lacunes arrondies, d'aspect vacuolaire, provenant sans doute de la disparition d'éléments dégénérés apparaissent fréquemment au sein de cette zone de pycnose. Dans la plupart des cas, le cortex est normalement constitué, truffé de gonocytes sains. Il forme une bande continue, appliquée sur la région pycnotique de la médullaire. Ce cortex sain évolue pendant un certain temps au contact d'une médullaire aberrante. On y aperçoit de nombreuses cellules en division (fig. 44, Pl. XVII).

L'épithélium germinatif n'est cependant pas toujours bien distinct. Il est absent ou peu développé, parfois très coloré, de structure peu définie; on peut attribuer cette inhibition du développement au contact direct du gaz avec la zone épithéliale. Enfin dans 3 cas, le cortex est aussi partiellement nécrosé. La médullaire de la plupart des ovaires soumis à l'action de l'azote est électivement touchée; la structure testiculaire est supprimée. De nombreux noyaux en pycnose envahissent la totalité ou une partie de ce constituant femelle. Comment évolue la gonade, si le séjour en atmosphère normale est prolongé?

2) Observation des gonades fixées 3 jours après le traitement à l'azote. Après 4 jours de culture, la gonade femelle présente un aspect opaque. Une frange transparente et lobée l'entoure. Mais après 6 jours de culture, on constate que cet aspect laiteux disparaît; la médullaire retrouve son aspect transparent.

L'étude histologique confirme cette régression. De nombreux noyaux pycnotiques ont disparu, remplacés par une zone désorganisée; celle-ci est d'aspect sain, envahie par de petites vacuoles ou par un système lacunaire. Dans ce dernier s'accumulent parfois des éléments pycnotiques (fig. 45, Pl. XVII).

Le cortex peut subsister normalement ou même prendre un aspect hypertrophié. Dans 2 cas sur 9, la partie corticale est réduite. On distingue un reste de l'épithélium germinatif et quelques gonocytes. Un réseau de lacunes et de vacuoles occupe la partie basale de la glande. On peut supposer qu'une partie importante de la médullaire, atteinte par la pycnose a dégénéré. Les cellules saines du cortex auraient repeuplé une partie de la gonade. En effet, la région corticale qui subsiste est partiellement stérile, alors que de nombreux gonocytes se retrouvent dans la zone médullaire.

Ces expériences montrent que l'action de l'azote est réversible.

Les foyers pycnotiques disparaissent et font place à une médullaire peu différenciée et lacuneuse.

Evolution de la glande génitale mâle. — Le testicule, évoluant comme la médullaire femelle, présente différents degrés d'inhibition :

1) L'atteinte est légère et n'affecte que le centre de la gonade. A la périphérie, des tubes testiculaires sains, ainsi que l'albuginée subsistent. En général, la pycnose débute au centre et s'étend vers les zones périphériques de la glande. La région saine qui subsiste renferme toujours de nombreux gonocytes. Dans de nombreux cas, des formations lacunaires ou vacuolaires sont associées à ces éléments pycnotiques.

2) La gonade entière est atteinte ; elle est occupée par de nombreux noyaux en pycnose. Cependant, la membrane périphérique ainsi que l'albuginée sont conservées intactes.

Si l'évolution en atmosphère normale se prolonge encore pendant 2 ou 3 jours, on observe comme chez une femelle, la régression de la zone pycnotique. La gonade « récupère » et continue son développement aux dépens du tissu resté sain. L'examen histologique de ce testicule montre un ensemble de structure peu définie, caractérisé par de nombreuses lacunes ; parmi celles-ci, on aperçoit des noyaux aberrants et des éléments sains. Si la nécrose est néanmoins trop avancée au stade de 4 jours, la récupération n'est guère possible, et la gonade dégénère.

Conclusions.

Ces expériences montrent qu'en l'absence d'oxygène, les glandes génitales de l'embryon de poulet évoluent de façon aberrante. De nombreux noyaux en pycnose occupent le testicule et l'un des constituants de l'ovaire : la partie médullaire. Celle-ci, dans les cas les plus accentués, subit une nécrose complète, alors que le cortex continue d'évoluer normalement. Si on prolonge la culture en atmosphère normale, les noyaux en pycnose régressent, pour faire place à une structure moins nécrotique, caractérisée par la présence de cellules éosinophiles et de vacuoles. Les formations testiculaires sont totalement inhibées. Des zones de lacunes occupent la région du hile. Elles renferment de nombreux noyaux en pycnose dans les cas d'inhibition les plus accentués.

L'inhibition de la médullaire des gonades traitées à l'azote pendant 48 heures, puis cultivées en présence d'une atmosphère normale pendant 3 jours, rappelle, dans une certaine mesure, celle qu'on obtient avec la tryptaflavine. En effet, la structure testiculaire disparaît, remplacée par une structure peu différenciée. Les ovaires traités par la tryptaflavine ont une médullaire toujours dissociée par des lacunes ; dans le cas des gonades exposées à l'azote, la structure vacuolaire prédomine. Dans ces vacuoles, on observe souvent un noyau isolé. Des lacunes de dimensions variées occupent la zone du hile ; mais elles sont moins étendues que dans le cas de la tryptaflavine.

Le testicule présente une inhibition analogue ; des noyaux pycnotiques disparaissent. Ils sont remplacés par un tissu indifférencié dans lequel on distingue des zones de dégénérescence : noyaux aberrants, petite lacunes et formations vacuolaires. Il semble que ce tissu se forme aux dépens de territoires

restés sains ; le testicule entièrement atteint par la pycnose dégénère rapidement et meurt.

D'après ces expériences, la partie testiculaire de la glande se montre plus sensible que le cortex, à une carence en oxygène. La nécrose, en effet, débute toujours immédiatement en arrière du cortex, la zone localisée du côté du hile restant saine. Si le territoire de nécrose s'étend, il gagne la région du hile, le cortex étant conservé, du moins pendant un certain temps.

Cependant, on pouvait se demander, si cette atteinte de la médullaire était réellement élective ou si elle ne dépendait pas de la position profonde du tissu. A cet effet, j'ai réalisé quelques expériences complémentaires, en cultivant la gonade en position inversée, la zone corticale étant appliquée contre le milieu de culture, et le hile se trouvant en contact avec l'atmosphère gazeuse. Dans les quatre gonades ainsi traitées, on observe une inhibition très nette de la zone médullaire, qui dans ces conditions de traitement, est également envahie par de nombreux noyaux pycnotiques. Mais le cortex aussi est atteint partiellement. En effet, dans la zone médiane d'une coupe d'ovaire, on aperçoit des noyaux en pycnose mêlés aux gonocytes. Ceux-ci sont en nombre réduit. Les parties extrêmes de la coupe présentent néanmoins un cortex sain et normalement constitué. Il semble donc que la pycnose progresse de la zone centrale de la gonade vers le tissu appliqué contre le milieu de culture.

Mais dans tous les cas, on constate que le cortex résiste mieux à l'asphyxie que la médullaire, même lorsqu'il est placé contre le milieu. Il existe donc une différence de sensibilité nette entre les deux tissus.

Il est intéressant de constater qu'on peut obtenir avec l'azote, un effet semblable à celui de certaines substances tératogènes ; l'un des constituants de l'ovaire, électivement atteint, occupé par de nombreux noyaux pycnotiques ou par un réseau de lacunes dégénère.

On peut se demander, quelle est l'action d'une atmosphère d'oxygène sur les gonades cultivées *in vitro* ?

III. — Evolution des gonades en présence d'oxygène.

Parallèlement aux expériences réalisées en atmosphère d'azote, nous avons laissé les explants gonadiques en atmosphère d'oxygène. Sur 51 explants ainsi traités, 27 sont de sexe femelle et 24 sont de sexe mâle. Certains sont exposés à l'action du gaz pendant 2 jours, d'autres pendant 4 et 5 jours. Les fixations ont lieu après 4 ou 6 jours de culture.

Après 48 heures de contact, l'évolution femelle s'avère normale. Si l'action se prolonge (5 jours de contact avec le gaz), des signes de dégénérescence apparaissent ; ils sont caractérisés par une inhibition portant à la fois sur le cortex et sur la médullaire. Celle-ci est constituée par un tissu dépourvu de toute organisation, occupé par de nombreux noyaux en pycnose. Le cortex est également atteint. Il se nécrose et s'effrite. Des foyers de gonocytes sains persistent en certains endroits de l'ovaire.

Le testicule se comporte comme l'ovaire ; il est partiellement ou complètement détruit après 4 ou 5 jours d'évolution en atmosphère d'oxygène.

Ces expériences montrent que l'oxygène peut, dans certaines conditions, exercer une action toxique sur les gonades cultivées *in vitro*. Mais à l'opposé de l'action : azote, l'effet n'est pas spécifique, les deux constituants sont atteints ; après 2, 3 ou 4 jours de contact, la médullaire conserve sa structure testiculaire et ne montre aucun signe de régression.

G. — Résumé des anomalies provoquées par les différents agents tératogènes.

Ces expériences montrent la sensibilité différentielle de certains constituants de la gonade envers les poisons mitotiques et certains inhibiteurs métaboliques.

Les anomalies obtenues au cours de nos expériences se répartissent en trois catégories qui sont représentées sur le tableau figure 10 :

1) Inhibition de l'évolution de la région médullaire femelle et des structures testiculaires mâles.

La dégénérescence de ces territoires se présente sous deux aspects :

a) Un réseau de lacunes remplace la structure normalement massive du testicule et de la médullaire. Les formations testiculaires disparaissent partiellement ou complètement. Le cortex est conservé, mais son développement n'est pas stimulé. Jusqu'à présent, seule la tryptaflavine, parmi les substances tératogènes, produit cette altération de la médullaire et du testicule de façon constante. Quelques organes traités avec le cacodylate de sodium présentent également des formations lacunaires réduites.

Cette évolution anormale de la médullaire se retrouve aussi chez les ovaires et testicules soumis pendant 40 heures à 48 heures à l'atmosphère d'azote, puis évoluant pendant 3 jours dans des conditions normales. La nécrose initiale observée 24 heures après le traitement disparaît pour faire place à un système de petites lacunes.

b) De nombreux noyaux pycnotiques s'accumulent dans la zone médullaire. Le tissu conserve son aspect compact. Le cortex est sain, parfois légèrement réduit, comparé à celui de la gonade témoin. Cet aspect nécrotique de la médullaire est visible chez des ovaires traités avec le cyanure de potassium ou exposés à une carence en oxygène.

2) Destruction de la région corticale, qui sous l'action du poison est inhibée ou se détache par petits fragments de la partie médullaire. Celle-ci est épargnée du moins pendant un certain temps et, dans les cas les plus favorables, la gonade femelle prend un aspect de testicule. Cette évolution aberrante a été obtenue avec des poisons caryoclasiques : colchicine et hydroquinone, cacodylate de sodium et narcotine.

3) La vacuolisation partielle ou totale des deux constituants gonadiques de l'ovaire et du testicule est produite par des substances, telles que la nicotine, l'atropine, la quinine et la vératrine.

Elles n'agissent pas de façon spécifique. Elles attaquent à la fois le cortex et la médullaire.

Ces différents types de poisons perturbent l'évolution des glandes génitales, cultivées *in vitro*. Certains de leurs territoires, soit la médullaire, soit le cortex ovarien sont spécifiquement atteints.

Il convient cependant de signaler que toutes les substances ne donnent

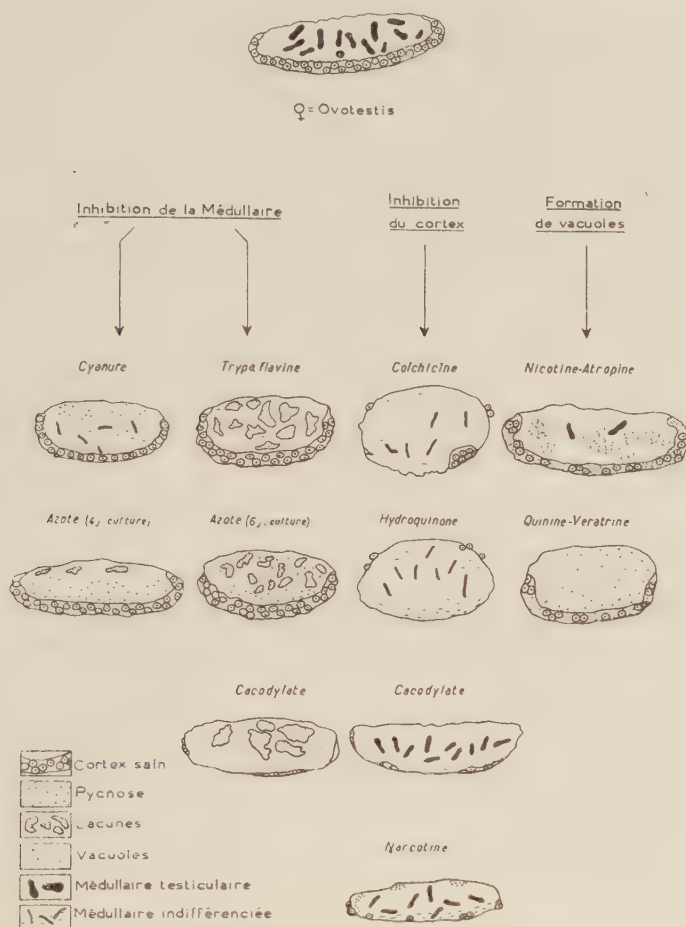


Fig. 10. — Tableau montrant l'action de différentes substances tératogènes sur la glande génitale femelle cultivée *in vitro*.

pas forcément l'une ou l'autre de ces anomalies. Ainsi le sulfate d'ésérine, la saponine, le mono-iodacétate de sodium, l'uréthane n'ont pas donné de résultats dans nos conditions expérimentales. Utilisées à doses élevées, elles produisent des nécroses ; à concentrations plus faibles, la structure des gonades est identique à celle des témoins. Ainsi certaines substances exercent une action tératogène spécifique sur l'organe génital cultivé *in vitro*, alors que d'autres n'ont aucun pouvoir électif.

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE

Les expériences qui viennent d'être relatées, montrent que des substances toxiques variées, introduites dans le milieu de culture, perturbent l'évolution des gonades embryonnaires explantées. Un même facteur tératogène peut agir électivement sur certains ensembles cellulaires et être sans action sur d'autres. Cette « sensibilité différentielle » avait été signalée par DUSTIN (1929), lors de ses expériences d'injection de poisons caryoclasiques à des rats et souris. Ainsi dans le thymus, seuls les thymocytes corticaux sont touchés par la tryptaflavine ; les thymocytes médullaires résistent au contraire au poison. Dans le testicule, la tryptaflavine se fixe de préférence sur les cellules interstitielles, alors que les mitoses séminales, si sensibles à l'action des radiations sont respectées. La tryptaflavine, éprouvée sur des gonades embryonnaires du poulet cultivées *in vitro*, agit directement sur la partie médullaire de la glande génitale et laisse intactes les cellules germinales. D'autres poisons, tels la colchicine, le cacodylate ont une action inverse : le cortex ovarien, constitué en grande partie de cellules germinales, dégénère.

Nous avons d'autre part constaté, au cours de nos expériences, que des conditions de culture défavorables peuvent parfois imiter ces actions tératogènes dues aux facteurs toxiques.

P. DUSTIN Jr. (1947), basant ses observations sur les lésions cellulaires, distingue les poisons métaphasiques ou fusoriaux (colchicine) des poisons préprophasiques ou radiomimétiques (tryptaflavine). Entre ces 2 groupes se placent les arsenicaux, poisons qui, d'une part arrêtent de nombreuses mitoses au stade métaphase et d'autre part détruisent de nombreuses cellules par pycnose. ANCEL (1952), classant un certain nombre de substances tératogènes d'après les malformations qu'elles provoquent chez l'embryon de poulet, constate une concordance entre ses subdivisions et celles de DUSTIN.

Un effet semblable s'observe chez des ovaires traités *in vitro* par ces substances toxiques. Les poisons métaphasiques inhibent la région corticale, la tryptaflavine agit sur la médullaire. L'action du cacodylate de sodium se répercute dans quelques cas sur les 2 constituants : inhibition du cortex et lacunisation de la médullaire.

Quel est le mécanisme d'action de ces différentes substances tératogènes ? Cette action est complexe et on ne peut formuler que des hypothèses.

L'action caryoclasique des substances pourrait être responsable des effets différentiels observés au cours de ces expériences. En effet, les agents chimiques dont l'action sur les noyaux est voisine de celle de la colchicine provoquent une même altération de la glande génitale : la décortication de l'ovaire. Les cellules germinales seraient particulièrement sensibles à l'inhibition mitotique de ces substances. Leurs divisions bloquées, elles dégénèrent, ce qui entraîne l'exfoliation et la destruction du cortex. Si cette dégénérescence s'observe dans quelques cas, elle n'est cependant pas toujours valable. De nombreux ovaires présentent une image différente ; des lambeaux de gono-

cytes sains, non pycnotiques se détachent du cortex. Dans la médullaire, les cellules germinales ne sont pas électivement atteintes. On peut donc se demander s'il s'agit d'une stérilisation partielle de la gonade, action qui rappellerait celle des rayons X ou bien si un autre mécanisme intervient, une inhibition enzymatique par exemple, qui provoquerait la dissociation du cortex.

Quant à l'atrophie de la médullaire par la trypaflavine, résulte-t-elle d'une action spécifique de cette substance sur les noyaux somatiques de la médullaire ? Ceux-ci, frappés par la pycnose, seraient voués à la dégénérescence et disparaîtraient en laissant des espaces lacunaires. Une telle inhibition a été notamment observée chez des gonades soumises à l'action de l'azote pendant 48 heures puis repiquées dans des conditions de culture normale pendant 2 ou 3 jours. La pycnose qui atteint la plupart des noyaux de la médullaire disparaît et fait place à un ensemble de lacunes et de vacuoles.

Il est probable que cette sorte d'autolyse, qui ne s'accompagne pas toujours de phénomènes pycnotiques, dépend d'un autre facteur métabolique ou enzymatique.

On sait que certaines malformations résultent de perturbations portant directement sur des systèmes fermentaires. En effet, on peut supprimer l'action tératogène de certaines substances par l'administration d'agents antagonistes. Ainsi LANDAUER (1952) constate que les malformations des membres provoquées par l'acide borique sont supprimées après injection de riboflavine. Il voit dans ce résultat une perturbation des systèmes enzymatiques contenant de la riboflavine. De même l'action tératogène de l'insuline ou du cacodylate de sodium est inhibée par l'administration de l'amide nicotinique. En culture de tissus, LERTRÉ (1950) a montré la possibilité d'empêcher l'action antimitotique de la colchicine en laissant agir sur les cultures un agent antagoniste, l'A. T. P.

Il est possible que les poisons cellulaires utilisés au cours de ces expériences agissent de façon analogue en altérant des processus métaboliques ou enzymatiques de certains ensembles cellulaires. On peut d'ailleurs se demander si la régression normale de la médullaire ovarienne n'est pas due à un tel processus de destruction par les enzymes ou des perturbations métaboliques qui seraient sous la dépendance de l'hormone femelle.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les résultats principaux qui se dégagent de l'ensemble de ces expériences peuvent être groupés en 2 catégories :

- 1) Sensibilité différentielle de certains ensembles cellulaires à un facteur tératogène donné.
- 2) Effets hormonomimétiques de certains de ces facteurs sur l'évolution de l'appareil génital.

1. Les facteurs extérieurs les plus variés, physiques ou chimiques agissent électivement sur certains tissus. Ainsi les rayons X frappent de préférence les cellules germinales. A un degré plus élevé, ils atteignent aussi les tissus somatiques dont l'évolution normale est perturbée et la croissance partiellement inhibée.

Les substances chimiques éprouvées directement sur des organes explantés *in vitro* provoquent également des effets spécifiques sur l'un ou l'autre de ces constituants gonadiques. La trypaflavine agit sur les parties testiculaires de la gonade, les substances du type colchicine, cacodylate, narcotine inhibent la zone corticale.

Nos observations, en accord avec celles d'ANGEL (1953), montrent que certaines doses seulement produisent une anomalie spécifique. Si ces doses sont plus élevées, on voit apparaître plusieurs anomalies, l'effet obtenu est moins spécifique.

De telles actions différentielles sur les organes ou les tissus, après traitement par les substances toxiques ont été signalées en particulier par DUSTIN, ANGEL, LANDAUER. Des faits analogues se retrouvent chez les invertébrés : échinodermes et mollusques. HÖRSTADIUS (1953) d'une part, RAVEN (1952) d'autre part, ont montré que le développement embryonnaire des œufs pouvait être modifié par des substances variées. Certaines exercent une action végétativisante, favorisant le développement des régions entodermiques, d'autres produisent un effet animalisant, favorisant l'extension des régions ectodermiques.

2. Certains facteurs tératogènes reproduisent à un faible degré des effets hormonaux. A cet égard, l'action des rayons X sur l'appareil génital de poulet ou de canard est particulièrement nette. Les radiations provoquent la féminisation des gonades mâles et le maintien des canaux de Müller chez l'embryon mâle. Ces facteurs stimulent donc la formation d'un cortex sur le testicule et le développement de canaux qui dans les conditions normales sont appelés à disparaître. La hausse de température agit de même, mais sur les canaux seulement. Ces deux facteurs physiques reproduisent donc un effet qui rappelle celui d'une hormone femelle.

Enfin, la trypaflavine éprouvée sur des organes en culture mime également l'action d'une hormone. Les formations testiculaires de l'ovotestis sont supprimées, remplacées par un réseau de lacunes. Sous l'action d'une substance toxique, l'ovaire est ramené à sa structure normale.

Les facteurs étudiés au cours de ces expériences montrent ainsi 2 types d'effets : un effet stimulateur et un effet inhibiteur. Il convient de remarquer que l'effet stimulateur réalisé par les rayons X peut être dû à une dénaturation de l'hormone mâle. L'effet inhibiteur observé après action des rayons X et la hausse de température serait provoqué par l'inhibition de la sécrétion d'hormone ♂ ou encore l'inactivation d'enzyme spécifique.

Les recherches sur l'action de facteurs physiques et chimiques ont déjà donné des résultats intéressants dans le domaine de l'embryologie. Elles ont montré la possibilité d'intervenir dans le développement et de modifier certains équilibres en favorisant ou en défavorisant l'évolution de telle ébauche ou de tel organe.

Ce travail apporte une contribution modeste à ces problèmes. A l'aide d'agents variés, on agit sur certains constituants de la glande génitale, en reproduisant des effets hormonaux ou même, on rétablit des phénomènes normaux du développement.

D'autres recherches seront nécessaires pour compléter cette étude, par exemple l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques spécifiques agissant sur un système

fermentaire bien défini et l'emploi de méthodes histochimiques et biochimiques quantitatives.

On peut ainsi espérer que l'étude de ces développements différentiels permettra d'élucider les mécanismes de la différenciation sexuelle normale.

RÉSUMÉ

1. Le but de ces recherches a été d'étudier l'action de facteurs externes sur la différenciation sexuelle et sur les différents constituants germinaux et somatiques de la glande génitale de l'embryon de poulet.

2. Les embryons sont soumis à l'action des rayons X (tension de 60 kV, intensité de 4 ou 8 mA, anticathode de tungstène, filtration nulle, distance de l'anticathode à l'œuf : 12 centimètres).

L'irradiation réalisée à un stade précoce (2 à 4 jours de l'incubation) se localise à la région gonadique (fig. 1 et 2); elle est suivie 24 heures ou 48 heures plus tard d'une irradiation totale. La plupart des embryons sont autopsiés vers le 15^e jour de l'incubation, stade auquel la différenciation sexuelle est nette.

3. Chez les sujets de sexe femelle, l'action des rayons X se répercute sur l'évolution de l'ovaire et sur le développement du canal de Müller droit. Les cellules germinales sont électivement atteintes (fig. 5, 6, Pl. XI).

Le canal de Müller droit, au lieu de régresser, est maintenu totalement ou partiellement.

4. Sous l'influence des rayons X, l'appareil génital de l'embryon mâle évolue de façon aberrante et présente 3 types de modifications :

a) Stérilisation complète et partielle des glandes génitales (fig. 19, Pl. XIII).

b) Intersexualité des gonades et des conduits génitaux (fig. 8, 9, Pl. XII). La gonade gauche est un ovotestis. L'étude histologique des gonades des intersexués révèle une structure mixte : un épithélium germinatif épais, un cortex et une zone lacunaire (caractères femelles) se trouvent en bordure du testicule (fig. 10 à 13, Pl. XII). Dans les cas plus faibles, il subsiste des fragments d'épithélium germinatif et des tubes testiculaires débouchant à la surface de la glande génitale, signes très faibles d'intersexualité (fig. 18, Pl. XIII).

Les intersexués obtenus par irradiation sont comparables à ceux qui ont été obtenus avec la méthode des injections d'hormones et des greffes d'ovaire.

c) Maintien des canaux de Müller chez des mâles non intersexués. Ces conduits présentent dans quelques cas un degré élevé d'intersexualité; certains évoluent selon le type III et IV de la classification d'Et. WOLFF et GINGLINGER (1935) (fig. 7).

D'autres persistent sous forme de tronçons ou de rudiments très faibles.

5. Les embryons mâles exposés à une élévation de la température de la couveuse (à 41°) pendant la période critique de la différenciation sexuelle (7 à 10 jours) conservent des conduits ou des rudiments müllériens. Les gonades ne sont pas affectées.

6. Ces recherches montrent que les agents physiques étudiés exercent leur action sur la différenciation sexuelle; les rayons X provoquent la féminisation partielle des gonades mâles génétiques. D'autre part, la température élevée et, dans certaines conditions, les rayons X empêchent la régression des canaux de Müller chez l'embryon mâle. On peut envisager que ces différents facteurs causent une perturbation de la sécrétion hormonale naturelle, soit en dénaturant l'hormone (cas des rayons X), soit en inhibant sa sécrétion ou encore en agissant sur une enzyme spécifique.

7. Des facteurs chimiques variés, poisons mitotiques et inhibiteurs de métabolisme, ont été expérimentés sur les gonades de l'embryon de poulet cultivées *in vitro*. On sait d'après les travaux d'E. WOLFF et de K. HAFEN (1952) que la glande génitale femelle de l'embryon de poulet explantée *in vitro* sur un milieu de gélose, de tyrode et d'extrait embryonnaire se différencie en ovotestis comprenant un cortex ovarien et un noyau testiculaire caractéristique. Cette anomalie encore mal élucidée est certainement due à un déséquilibre hormonal des constituants de l'ovaire en culture.

8. Les gonades sont prélevées à l'âge de 9 et 10 jours et sont cultivées sur un milieu renfermant la substance chimique. Elles sont fixées après 3 à 6 jours de culture.

9. Les effets obtenus au cours de ces expériences intéressent surtout la gonade femelle et se répartissent en 3 catégories (fig. 10).

a. Inhibition de la structure testiculaire de la médullaire ♀. La structure massive de l'ovaire disparaît. Les formations testiculaires sont remplacées par un réseau de lacunes. Le cortex se maintient normalement, sans subir de stimulation. Cette inhibition par formation de lacunes s'observe chez des ovaires et testicules traités par la trypaflavine (fig. 26, Pl. XIV, Pl. XV et fig. 32, Pl. XVI) et dans quelques cas par le cacodylate de sodium.

Les organes soumis à l'anaérobiose pendant 40 à 48 heures, puis cultivés dans des conditions normales durant 2 ou 3 jours présentent une altération identique : la médullaire est occupée par un système de petites lacunes et de vacuoles (fig. 45, Pl. XVII).

La pycnose constitue une autre forme de dégénérescence de la zone médullaire. Le tissu conserve son aspect compact, le cortex est sain. Les gonades traitées par le cyanure de potassium ou exposées à une carence en oxygène présentent ce type d'inhibition (fig. 43 et 44, Pl. XVII).

b. Destruction de la région corticale qui se dissocie et se détache par petites couches ; la médullaire est épargnée au moins un certain temps. Cette anomalie a été obtenue avec la colchicine, le cacodylate, l'hydroquinone et la narcotine (fig. 33 à 38, Pl. XVI, fig. 39, 40, Pl. XVII).

c. La vacuolisation partielle ou totale des 2 constituants est provoquée par la nicotine et la quinine. Dans les cas extrêmes, la différenciation sexuelle disparaît. De nombreux espaces vides provenant de la fusion de petites vacuoles occupent la gonade (fig. 41, 42, Pl. XVII).

10. L'évolution normale des glandes génitales se trouve ainsi perturbée sous l'influence de différents types de poisons. Certains tissus d'un même organe sont électivement sensibles à une substance tératogène. On peut penser que ces agents ont altéré des systèmes enzymatiques inégalement répartis dans les divers groupes cellulaires.

11. Ces recherches montrent que des facteurs physiques et chimiques variés influent sur le développement des organes sexuels. Ils agissent électivement sur certains tissus de la gonade et miment parfois des effets hormonaux.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ANCEL (P.). — 1950. — *La chimiotératogenèse chez les Vertébrés*. Ed. Doin, 393 pages, 80 fig. — 1952. — Essai de classification des substances chimiques électivement tératogènes. *C. R. Acad. Sci. Fr.*, **235**, n° 15, 764-766. — 1953. — Les bases chimiques de la tératogenèse chez les animaux. *Revue de Path. gén. et comp.*, n° 651, 976-1002.
- ANCEL (P.) et BOUÏN (P.). — 1904. — Recherches sur la signification physiologique de la glande interstitielle du testicule des Mammifères. II. Rôle de la glande interstitielle chez l'embryon, les sujets jeunes et âgés, ses variations fonctionnelles. *Journ. de physiol. et path. gén.*, **6**, 1039-1050, 1 pl.
- ANCEL (P.) et WOLFF (Et.). — 1933. — Sur la réalisation expérimentale des monstruosités. *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 798-801.
- BROCK (N.), DRUCKREY (H.) et HERKEN (H.). — 1939. — Über kerngifte und Cytoplasmagifte. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.*, **193**, 679-687.
- BUCHER (O.). — 1939. — Zur Kenntnis der Mitose VI. Der Einfluss von Colchicin und Trypflavin auf den Wachstumsrhythmus und auf die Zellteilung in Fibrozytenkulturen. *Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.*, **29**, 283-322. — 1940. — Zur Zytotoxikologie einiger Pharmaka (Arsenik, Colchicin, Trypflavin, Nikotin, Coramin). *Schweiz. med. Wochenschrift*, **70**, 910-911.
- BURNS (R. K.). — 1950. — Sex transformation in the opossum : some new results and a retrospect. *Arch. d'Anat. micr. et de Morph. exper.*, **39**, 467-481, 5 fig.
- CHEVREMONT (M. J. J.). — 1954. — Action et mécanisme d'action de quelques substances antimitotiques nouvelles. *Excerpta Medica*, **8**, n° 9, 432.
- CHEVREMONT (M.) et FIRKET (H.). — 1950. — Remarques sur les chromosomes des cellules cultivées *in vitro*. Action du KCN sur les cultures. *Bull. Ass. Anatomistes Fr.*, **61**, 56-60. — 1951. — Étude histochimique de l'action du béryllium sur la mitose en culture de tissus (phosphatase alcaline et acides nucléiques). *C. R. Soc. Biol.*, **145**, nos 11-12, 938-940.
- DANTCHAKOFF (V.). — 1933. — Keimzelle und Gonade. Sterilisierung der Gonaden im Embryo mittels Röntgenstrahlen. *Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.*, **18**, 56-110. — 1935. — Sur l'inversion sexuelle expérimentale de l'ébauche testiculaire, chez l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sci.*, **200**, 1983-1984.
- DANTCHAKOFF (V.) et LACASSAGNE (A.). — 1932. — Stérilisation par les rayons X de l'ébauche gonadique du Poulet. Ses effets sur le développement de la gonade. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, 1067-1069. — 1932. — Destructures localisées, dans l'embryon du Poulet, au moyen du rayonnement β du radon, pour l'étude expérimentale de l'origine des cellules sexuelles. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, 845-848.
- DULBECCO (R.). — 1946. — Sviluppo di gonadi in assenza di cellule sessuali nell'embrione di pollo. Sterilizzazione completa mediante esposizione a raggi γ , allo stadio di linea primitiva. *Rend. Acc. Naz. Lincei*, sér. VIII, vol. **1**, 1211-1213. — 1947. — Nuove ricerche sulla sterilizzazione di embrioni di pollo mediante irradiazione con raggi γ . Costante determinazione del sesso femminile negli embrioni irradiati. *Ibidem*, sér. VIII, vol. **2**, 659-662. — 1948. — Azione dei Raggi γ del radio sullo sviluppo della gonade e sui caratteri somatici del sesso nell'embrione di pollo. *Memorie. Atti della Accademia Nazionale dei Lincei*, sér. VII, vol. **2**, 1-20, 3 pl.
- DUSTIN (A. P.). — 1929. — Les poisons caryoclasiques, moyens d'analyse cytophysiologique. *Arch. Anat. micr.*, **25**, 37-48, 4 fig. — 1939. — A propos des applications des poisons caryoclasiques à l'étude des problèmes de pathologie expérimentale, de cancérologie et d'endocrinologie. *Arch. exper. Zellforsch.*, **22**, 395-406.

- DUSTIN (P.). — 1947. — Some new aspects of mitotic poisoning. *Nature*, **159**, 794-797.
- FIRKET (J.). — 1914. — Recherches sur l'organogenèse des glandes sexuelles chez les Oiseaux. *Arch. Biol.*, **29**, 201-352, 5 pl.
- GOLDSMITH (J. B.). — 1928. — The history of the germ cells in the domestic fowl. *Journal of Morphology*, **46**, 275-317, 7 pl.
- HAMPE (A.). — 1950. — Sur la continuation de la première poussée de cordons sexuels mâles, chez l'embryon de Poulet, sous l'influence des injections d'hormone femelle. *Arch. micros. Morph. exper. Fr.*, **39**, n° 1, 35-62, 24 fig.
- HÖRSTADIUS (S.). — 1953. — Vegetalization of the sea-urchin egg by dinitrophenol and animalization by trypsin and ficin. *J. Embryol. exp. morph.*, **4**, 327-348, 21 fig.
- HUGHES (A. F.). — 1950. — The effect of inhibitory on cell division. A study of living cells in tissue cultures. *Quart. J. micr. Sci.*, **91**, 251-278.
- JOST (A.). — 1946. — Castration de l'embryon mâle de Lapin. Données préliminaires. *C. R. Soc. Biol.*, **140**, 938-939. — 1947 a. — Sur les effets de la castration précoce de l'embryon mâle de Lapin. *Ibidem*, **141**, 126-129. — 1947 b. — Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de Lapin. 3^e partie : Rôle des gonades fœtales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch. d'Anal. micros. et de morph. exp.*, **36**, n° 4, 271 à 315, 18 fig.
- LANDAUER (W.). — 1948. — The effect of nicotin amide and α -ketoglutaric acid on the teratogenic action of insulin. *J. exp. Zool.*, **109**, n° 2, 283-290. — 1952. — Malformations of chicken embryos produced by boric acid and the probable role of riboflavin in their origin. *J. exp. Zool.*, **120**, 469-508, 5 fig.
- LETTRE (H.). — 1944. — Hemmung der Zellteilung durch oestrogene Faktoren. *Biol. Abstr.*, **18**, n° 9812. — 1946. — Ergebnisse und Probleme der Mitosegiftforschung. *Naturwissenschaften*, **33**, 75-86. — 1949. — Zum Problem der krebs-spezifischen Mitosegifte. *Z. Krebsforsch.*, **56**, 297-305, 1 fig. — 1950. — Über Mitosegifte. *Ergeb. Physiol.*, **46**, 379-452.
- LETTRE (H.) et LETTRE (R.). — 1946. — Aufhebung der Wirkung von Mitosegiften durch chemische Faktoren. *Naturwissenschaften*, **33**, 283-284.
- LEWIS (L. B.). — 1946. — A study of some effects of sex hormones upon the embryonic reproductive system of the white Pekin Duck. *Physiol. Zool.*, **19**, 282-329, 2 pl., 15 fig.
- LITS (F. J.). — 1936. — Recherches sur les réactions et lésions cellulaires provoquées par la colchicine. *Arch. Inter. méd. exp.*, **2**, fasc. 4, 811-898, 12 fig.
- LUDFORD (R. J.). — 1936. — The action of toxic substances upon the division of normal and malignant cells *in vitro* and *in vivo*. *Arch. exper. Zellforschg.*, **18**, 411-441.
- LUTZ-OSTERTAG (Y.). — 1954. — Contribution à l'étude du développement et de la régression des canaux de Müller chez l'embryon d'Oiseau. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **88**, n° 4, 333-412, 5 fig., 5 pl.
- LUTZ (H.) et LUTZ-OSTERTAG (Y.). — 1956. — Action des ultrasons sur l'enzyme protéolytique des canaux de Müller de l'embryon de Poulet ♂. *C. R. Soc. Biol.* (sous presse). — 1956. — Action des ultrasons sur le développement des canaux de Müller de l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sci.*, **242**, n° 4, 557-560.
- MAC ILWAIN (H.). — 1941. — A nutritional investigation of the antibacterial action of acriflavine. *Biochem. J.*, **35**, 1311-1319.
- MIRSKAIA et CREW. — 1931. — The effect of destruction of the spermatogenic tissue by X Rays upon certain secondary gonadic characters of the Cock. *Quart. J. exp. Physiol.*, **21**, 135-138, 7 fig., 3 pl.
- MÖLLENDORFF (W. v.). — 1937-1938. — Zur Kenntnis der Mitose. II. Mitteilung. Die Phasenverteilung in der Fibrozytenkultur und deren Abwandlung durch Substanzzusätze. *Zeitschr. Zellforsch. mikr. Anal.*, **27**, 301-325. — 1939. — Zur Kenntnis der Mitose. VIII. Zur Analyse des pathol. Wachstums hervorgerufen durch Chloralhydrat, Geschlechtshormone und Cancerogene Kohlenwasserstoffe. *J. Zellforsch.*, **39**, 706-749, 54 fig. — 1941. — Mitosenschädigung durch Geschlechtshormone und das Tumorphänomen. *Schweiz. med. Wochenschrift*, **71**, 329-331.

- PIQUET (J.). — 1930. — Détermination du sexe chez les Batraciens en fonction de la température. *Rev. Suisse Zool.*, **37**, n° 6, 173-281, 49 fig., 1 pl.
- POMERAT (C. M.) et WILLMER (E. N.). — 1939. — Studies on the growth of tissues in vitro. VII. Carbohydrate metabolism and mitosis. *Journ. of exper. Biol.*, **16**, 232-249.
- RAVEN (Ch. P.). — 1952. — Morphogenesis in *Linnea stagnalis* and its disturbance by lithium. *J. exp. Zool.*, **121**, n° 1, 1-78.
- RUBASCHKIN (W.). — 1907. — Über das erste Auftreten und Migration der Keimzellen bei Vögelembryonen. *Anat. Hefte I*, **35**, 241-261.
- SALZGEBER (B.). — 1953. — Action sélective de la trypaflavine sur la médullaire des glandes génitales de l'embryon de Poulet, cultivées in vitro. *C. R. Acad. Sci. Fr.*, **236**, n° 12, 1306-1308. — 1955. — Modifications observées dans les organes génitaux de l'embryon de Poulet explantés in vitro, après traitement par différentes substances tératogènes. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 190-192.
- SCHIEB-PFLEGER (D.). — 1955. — Contribution biochimique à l'étude des processus de différenciation des canaux de Müller chez l'embryon de Poulet. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **89**, fasc. 4, 405-479, 22 fig., 7 pl.
- STOLL (R.). — 1945. — Pseudo-hyperféminisation obtenue chez l'embryon de Poulet par l'action d'agents physiques et chimiques. *C. R. Soc. Biol.*, **139**, 151-152. — 1948. — Action de quelques agents physiques et chimiques sur les canaux de Müller de l'embryon de Poulet. *Arch. d'Anat. micr. et de morph. exp.*, **37**, n° 4, 333-346, 3 fig.
- SWIFT (C. H.). — 1914. — Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Amer. Journ. Anat.*, **15**, 483-516, 15 fig. — 1915. — Origin of the definitive sex cells in the female chick and their relation to the primordial germ cells. *Amer. Journ. Anat.*, **18**, 441-470, 8 fig. — 1916. — Origin of the sex cord and definitive spermatogonia in the chick. *Amer. Journ. Anat.*, **20**, 375-410, 6 fig.
- TSCHASCHIN (S.). — 1910. — Über die Chondriosomen der Urgeschlechtszellen bei Vögelembryonen. *Anal. Anzeiger*, **37**, 597-607.
- UCHIDA (T.). — 1937. — Studies of the sexuality of Amphibia. III. Sex transformation in *Hydnobius retardatus* by the function of high temperature. *J. fac. Sci. Hokkaido. Imp. Univ.*, sér. VI, **6** (cité d'après ANCEL (P.), 1952).
- VERNE (J.). — 1948. — Sensibilité et accoutumance aux toxiques des cellules cultivées in vitro. *J. Physiol.*, **40**, 1-21, 7 fig.
- VERNE (J.) et VILTER (V.). — 1940 a. — Étude de l'action de la colchicine sur les mitoses des fibroblastes cultivés in vitro. Concentrations dites fortes. *C. R. Soc. Biol.*, **133**, 618-621. — 1940 b. — Mécanisme d'action de la colchicine employée en concentrations faibles sur l'évolution de la mitose dans les cultures de fibroblastes in vitro. *C. R. Soc. Biol.*, **133**, 621-624.
- WILLIER (B. H.), GALLAGHER (T. F.) et KOCH (F. C.). — 1935. — Sex modification in the chick embryo resulting from injections of male and female hormones. *Proc. of the Nation. Acad. of Sci.*, **21**, 625-631.
- WILLIER (E.) et YUH (C.). — 1928. — The problem of sex differentiation in the chick embryo with reference to the effects of gonad and non gonad grafts. *Journ. of exp. Zool.*, **52**, 65-127, 3 pl.
- WITSCH (E.). — 1929. — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. II. Sex reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. *J. of exp. Zool.*, **52**, 267-280.
- WOLFF (Émilienne). — 1950. — La différenciation sexuelle normale et le conditionnement hormonal. Des caractères sexuels somatiques précoces. Tubercule génital et Syrinx chez l'embryon de Canard. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **84**, fasc. 2, 121-185, 52 fig.
- WOLFF (Et.). — 1936. — Les bases de la tératogenèse expérimentale des Vertébrés amniotes, d'après les résultats de méthodes directes. *Arch. d'Anat. d'Hist. et d'Embr.*, **22**, 1-382, 105 fig., 3 pl. — 1946. — *Les changements de sexe*. Gallimard, Paris, 297 pages, 56 fig., 24 pl. — 1946-1947. — Recherches sur l'intersexualité expérimentale produite par les méthodes des greffes de gonades à l'embryon de Poulet. *Arch. d'Anat. micr. et de morph. exp.*, **36**, n° 1, 69-90, 25 fig. — 1949. — L'évolution des canaux de Müller de l'embryon d'Oiseau après castration pré-

- coce. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, nos 17-18, 1239-1241. — 1949. — Sur une technique de castration chez l'embryon d'Oiseau. *C. R. Soc. Biol.*, **144**, nos 9-10, 526-529. — 1950. — Le rôle des hormones embryonnaires dans la différenciation sexuelle des Oiseaux (Colloque sur la différenciation sexuelle chez les Vertébrés). *Arch. d'Anat. micr. et de morph. exp.*, **39**, n° 3, 426-450, 8 fig. — 1953. — Le déterminisme de l'atrophie d'un organe rudimentaire : le canal de Müller des embryons mâles d'Oiseaux. *Experientia*, **9**, fasc. 4, 121-133, 18 fig.
- WOLFF (Et.) et GINGLINGER (A.). — 1935. — Sur la transformation des Poulets mâles en intersexués par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *Arch. d'Anat. d'Hist. et d'Em.*, **20**, 223-278, 16 fig.
- WOLFF (Et.) et HAFEN (K.). — 1951. — Sur les résultats de la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des Oiseaux. *C. R. Soc. Biol.*, **145**, 1388-1391, 2 fig. — 1952. — Sur la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de l'embryon de Poulet en culture *in vitro*. *Annales d'Endocrinologie*, **13**, n° 5, 724-731, 5 fig.
- WOLFF (Et.) et HAMPE (A.). — 1950. — Sur la reprise de la poussée des cordons sexuels mâles sous l'influence d'injections d'une hormone femelle à l'embryon d'Oiseau. *C. R. Soc. Biol.*, **144**, nos 15-16, 1100-1102.
- WOLFF (Et.) et LUTZ-OSTERTAG (Y.). — 1952. — La différenciation et la régression des canaux de Müller de l'embryon de Poulet en culture *in vitro*. *C. R. Assoc. Anat.*, 39^e Réunion (Clermont-Ferrand), pp. 214-228, 9 fig.
- WOLFF (Et.) et SALZGEBER (B.). — 1949. — Sur un nouveau procédé permettant d'obtenir l'intersexualité expérimentale chez l'embryon d'Oiseau : l'irradiation des gonades embryonnaires à l'aide des rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 532-533.
- WOLFF (Et.) et WOLFF (Em.). — 1947. — Sur les stades de réceptivité aux hormones femelles des gonades et des voies génitales chez l'embryon de Poulet mâle. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, 415-416.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Cellules embryonnaires et cellules cancéreuses.
Ressemblances et distinctions.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 12 janvier 1957.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.

PLANCHE XI

Action des rayons X sur la glande génitale femelle.

- Fig. 1. — Coupe transversale d'un ovaire témoin provenant d'un embryon de poulet âgé de 15 jours (Gr. $\times$ 75).
- Fig. 2. — Fragment d'une coupe transversale d'un ovaire montrant une partie du cortex et de la médullaire (Gr. $\times$ 218).
- Fig. 3. — Coupe transversale des gonades gauche et droite de l'embryon femelle (n° 474) âgé de 15 jours. Cortex réduit et stérile. La structure de la gonade gauche est ramenée à celle de la gonade droite (Gr. $\times$ 82).
- Fig. 4. — Coupe transversale d'un ovaire gauche (n° 386) de 15 jours. Absence de cortex; la médullaire réduite est occupée par de vastes lacunes (Gr. $\times$ 75).
- Fig. 5. — Fragment d'une coupe transversale d'un ovaire partiellement stérile (n° 340) âgé de 15 jours. Les éléments germinaux sont absents (Gr. $\times$ 218).
- Fig. 6. — Fragment d'une coupe transversale d'un ovaire partiellement stérile (n° 405) âgé de 16 jours. Disparition des nids à ovogonies (Gr. $\times$ 131).
- Fig. 7. — Coupe au fort grossissement de l'ovaire de l'embryon n° 318. Le cortex présente des évaginations qui font saillie à la surface de l'organe (Gr. $\times$ 330).
- c*, cortex; *eg*, épithélium germinatif; *no*, nids à ovogonies; *m*, médullaire; *cg*, cellules germinales; *lac*, lacunes.

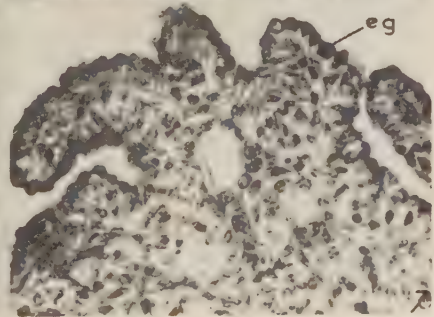
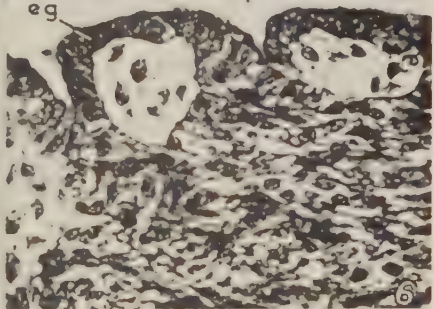
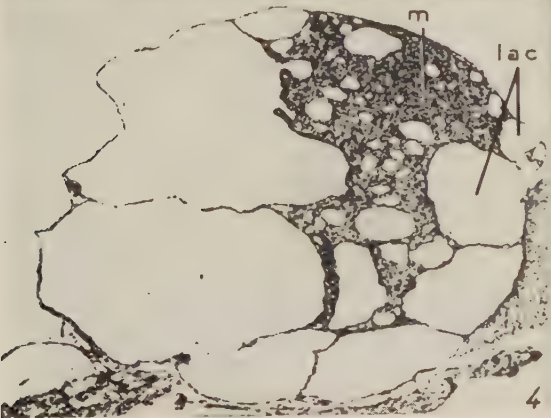
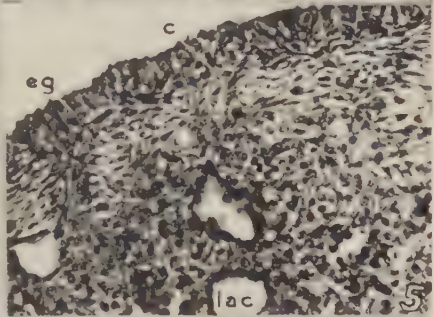
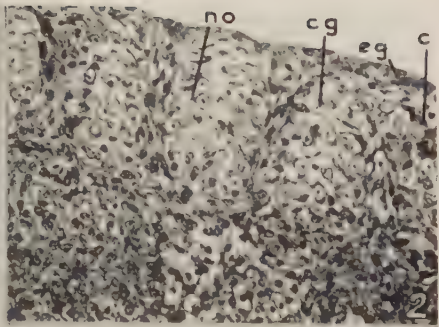
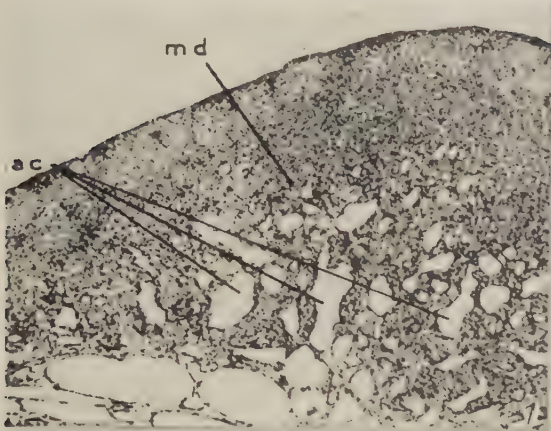


PLANCHE XII

PLANCHE XII

Action des rayons X sur l'évolution de l'appareil génital mâle.

- Fig. 8. — Intersexué n° 380 âgé de 15 jours. Aspect morphologique de l'appareil génital. La gonade gauche (Ov) est un ovotestis, la gonade droite (td) est un testicule. Tractus müllérien de type femelle. Le canal de Müller gauche (CMg) présente pavillon (pav) et trompe (tr) à sa partie antérieure, glande coquillière (Glc) à sa partie postérieure. Le canal de Müller droit (CMd) est réduit (Gr. $\times 5,2$).
- Fig. 9. — Intersexué n° 446 âgé de 15 jours. La gonade gauche (Ov) a l'aspect d'un ovaire. Tronçon d'oviducte (CMg) dans la région proximale (Gr. $\times 8,1$). Td, testicule droit.
- Fig. 10. — Structure de la gonade gauche de l'intersexué n° 312 âgé de 17 jours. Les zones lacunaires (lac) et corticales (c) se décolle nettement de la partie médullaire qui renferme des cordons testiculaires (tt). Sur cette même figure, présence d'un fragment du testicule droit (Gr. $\times 70$).
- Fig. 11. — Fragment de l'ovotestis (fig. 10) au fort grossissement. Des lacunes (lac) de type femelle, dans lesquelles on aperçoit des cellules en dégénérescence sont en contact avec la zone testiculaire; c, cortex (Gr. $\times 140$).
- Fig. 12. — Structure de la gonade gauche de l'intersexué n° 324 âgé de 15 jours. Coupe transversale. Ovotestis avec un cortex ovarien (c) séparé des cordons testiculaires (tt) par une zone de lacunes (lac) (Gr. $\times 60$).
- Fig. 13. — Détail de la zone corticale de l'ovotestis. Structure d'un cortex (c) femelle partiellement stérile. lac, lacunes; eg, épithélium germinatif (Gr $\times 472$).
-

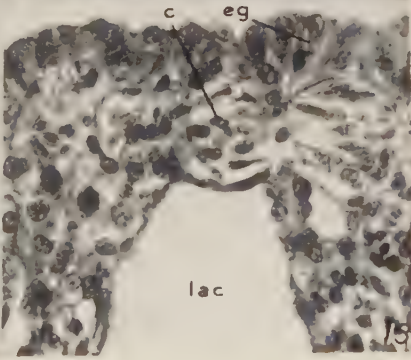
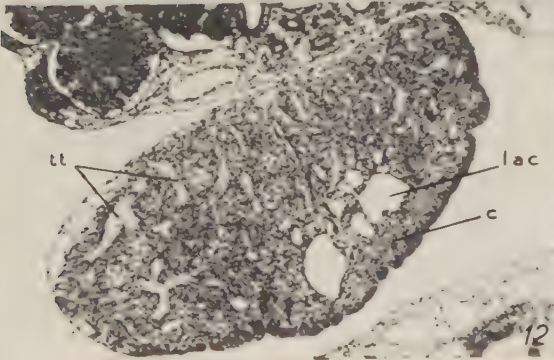
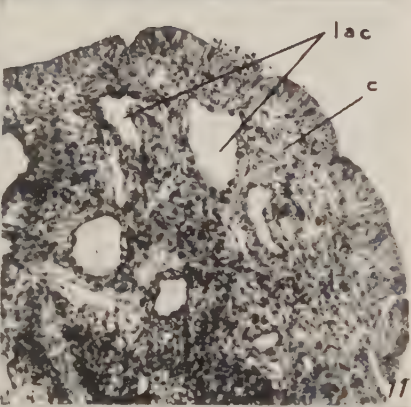
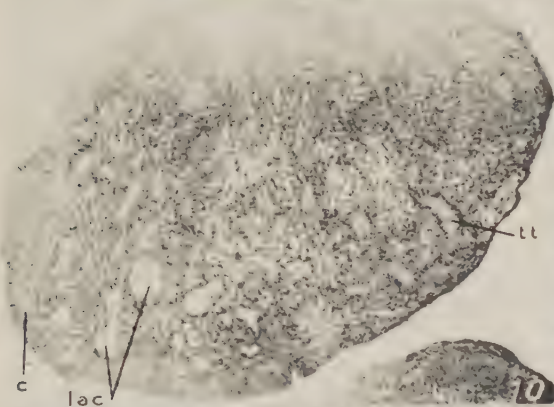
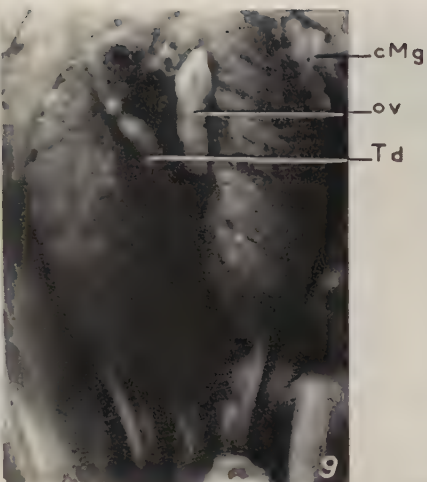
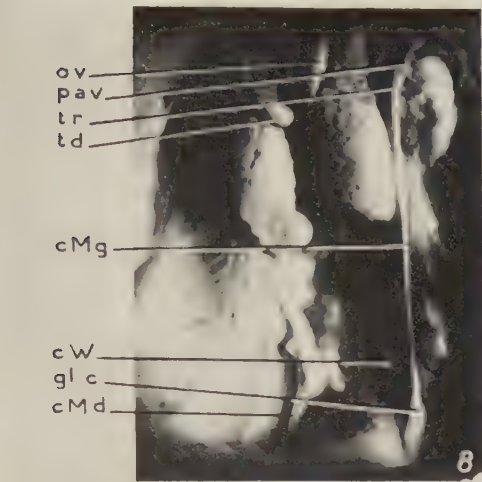


PLANCHE XIII

PLANCHE XIII

PLANCHE XIII

Action des rayons X sur le testicule.

- Fig. 14. — Aspect histologique de la gonade gauche de l'intersexué n° 298. Un cortex épais (*c*) revêt la gonade. Les cordons de Pflüger renferment de nombreux ovocytes. Pas de zone de lacunes entre cortex et testicule (*tt*) (Gr. $\times 124$).
- Fig. 15. — Fragment de la zone corticale (fig. 14) au fort grossissement. Nombreux nids à ovocytes (*no*); *cg*, cellules germinales (Gr. $\times 337$).
- Fig. 16. — Fragment d'une coupe de la gonade gauche de l'intersexué n° 413. Le cortex est échancré. A la partie inférieure, présence de cordons testiculaires. *cg*, épithélium germinatif (Gr. $\times 217$).
- Fig. 17. — Coupe transversale (fragment) de la gonade gauche de l'intersexué n° 446. Le cortex est en contact avec les cordons testiculaires. Absence d'une zone lacunaire bien développée entre le cortex et la partie testiculaire. *c*, cortex; *cg*, cellules germinales; *tt*, tubes testiculaires (Gr. $\times 217$).
- Fig. 18. — Fragment d'une coupe de gonade gauche (n° 375), 15 jours. L'épithélium germinatif invaginé est en rapport avec un tube testiculaire. *cg*, épithélium germinatif; *tt*, tubes testiculaires (Gr. $\times 157$).
- Fig. 19. — Aspect histologique d'un testicule stérile, non intersexué provenant de l'embryon n° 327 âgé de 15 jours. La structure de la gonade est celle d'un testicule dépourvu de gonocytes (Gr. $\times 218$).
-

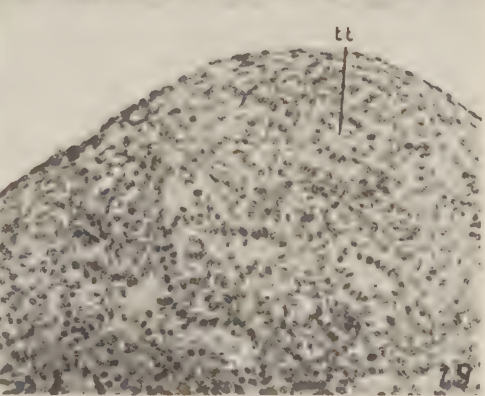
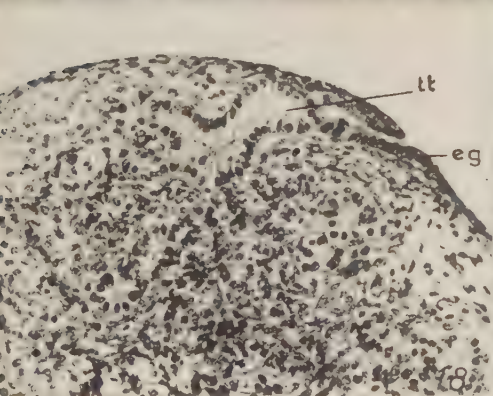
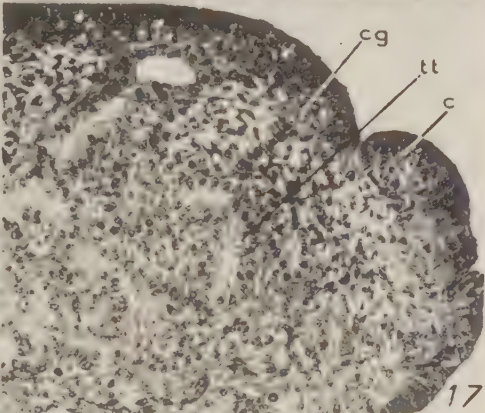
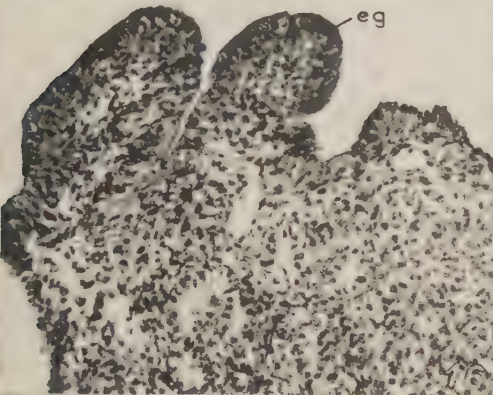
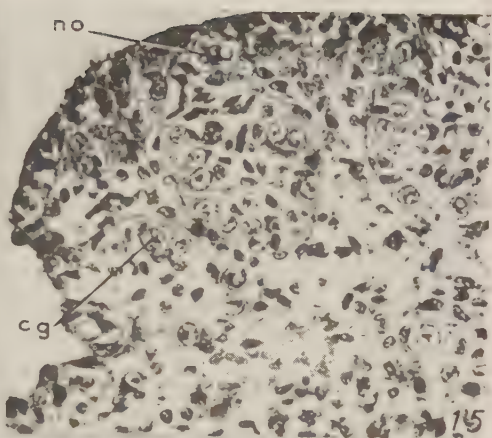
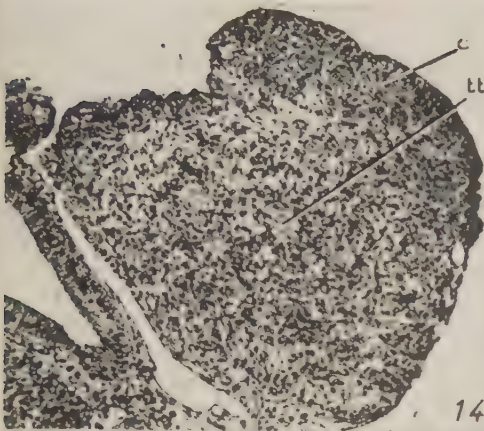


PLANCHE XIV

PLANCHE XIV

Action de substances inhibitrices sur la différenciation des gonades cultivées in vitro.

- Fig. 20. — Testicule témoin de poulet sur milieu standard. Prélèvement au stade de 10 jours. Durée de la culture : 4 jours. Aspect morphologique (Gr. $\times 16$).
- Fig. 21. — Aspect histologique du testicule témoin. Structure normale de testicule. *al*, albuginée, *tt*, tubes testiculaires; *cg*, gonocytes (Gr. $\times 120$).
- Fig. 22. — Détail de la figure précédente (Gr. $\times 300$).
- Fig. 23. — Ovaire témoin de poulet sur milieu standard. Prélèvement au stade de 10 jours. Durée de la culture : 4 jours. Aspect morphologique. Une frange transparente et aplatie correspondant au cortex entoure la gonade (Gr. $\times 18$).
- Fig. 24. — Aspect histologique. La gonade est un ovotestis. Présence d'une médullaire (*md*) à tubes testiculaires (*tt*) et d'un cortex ovarien (*c*) (Gr. $\times 105$).
- Fig. 25. — Coupe transversale d'un ovaire non cultivé *in vitro* et âgé de 12 jours. Un réseau de lacunes occupe la région du hile. Dégénérescence de la zone médullaire (Gr. $\times 73$). *c*, cortex; *md*, médullaire.
- Fig. 26. — Ovaire de poulet cultivé sur milieu standard en présence de trypanflavine. Prélèvement au stade de 10 jours. Durée de la culture : 4 jours. Coupe transversale. La médullaire dégénère, transformée en un réseau lacunaire (*lac*). Le cortex (*c*) est normal, bourré de gonocytes (Gr. $\times 118$).
-

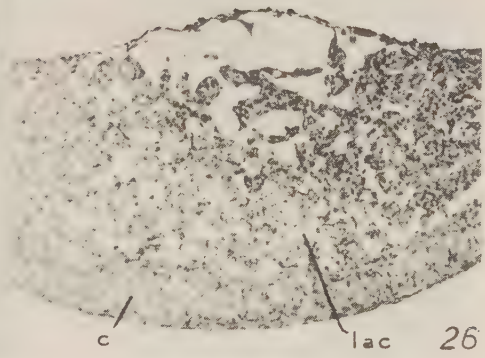
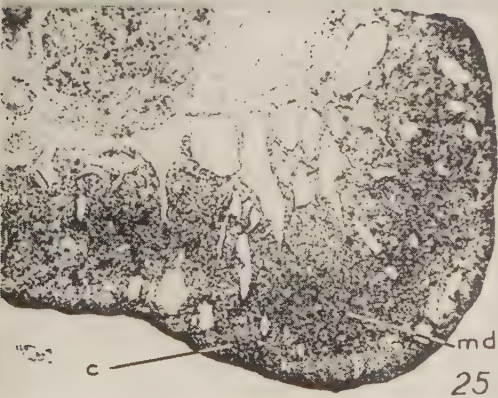
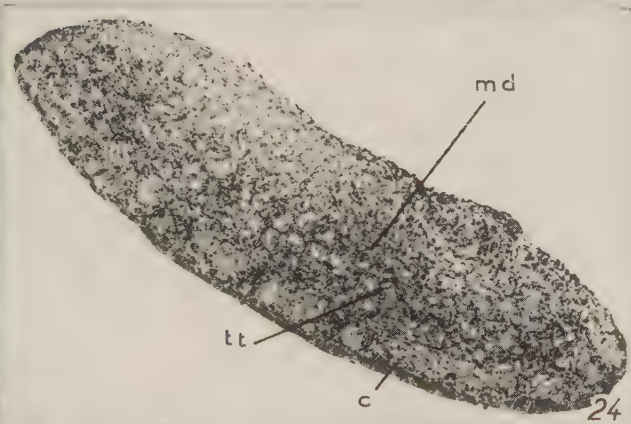
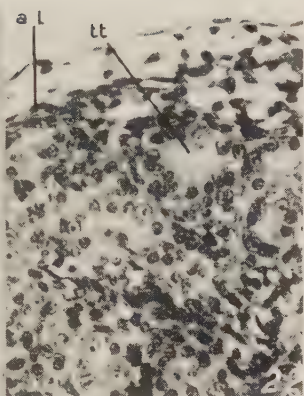


PLANCHE XV

PLANCHE XV

*Action de la trypaflavine sur l'évolution des gonades cultivées in vitro
(Inhibition de la médullaire ovarienne).*

- Fig. 27. — Gonade femelle prélevée à 10 jours et cultivée en présence de trypaflavine pendant 5 jours. Coupe transversale. Zone de grandes lacunes du côté du hile. Cortex bourré de gonocytes. *c*, cortex; *cg*, cellules germinales; *lac*, lacunes (Gr. $\times 120$).
- Fig. 28. — Détail de la zone lacunaire; on aperçoit des débris cellulaires à l'intérieur de la lacune (*lac*). Présence de vacuoles (*vac*). *cg*, gonocytes (Gr. $\times 630$).
- Fig. 29. — Ovaire explanté à 10 jours et cultivé en présence de trypaflavine pendant 5 jours. Formation d'une lacune (*lac*). Deux noyaux se détachent du milieu ambiant. *cg*, gonocytes (Gr. $\times 630$).
- Fig. 30. — Ovaire prélevé à 10 jours et cultivé en présence de trypaflavine pendant 5 jours. Détail d'une lacune. Amas de gonocytes en dégénérescence, à l'intérieur de la lacune. *cg*, gonocytes (Gr. $\times 630$).
- Fig. 31. — Ovaire normal témoin de 12 jours, non explanté. Présence de gonocytes (*cg*) dans une lacune (*lac*). La coupe passe par une région voisine du hile de l'ovaire (Gr. $\times 630$).
-

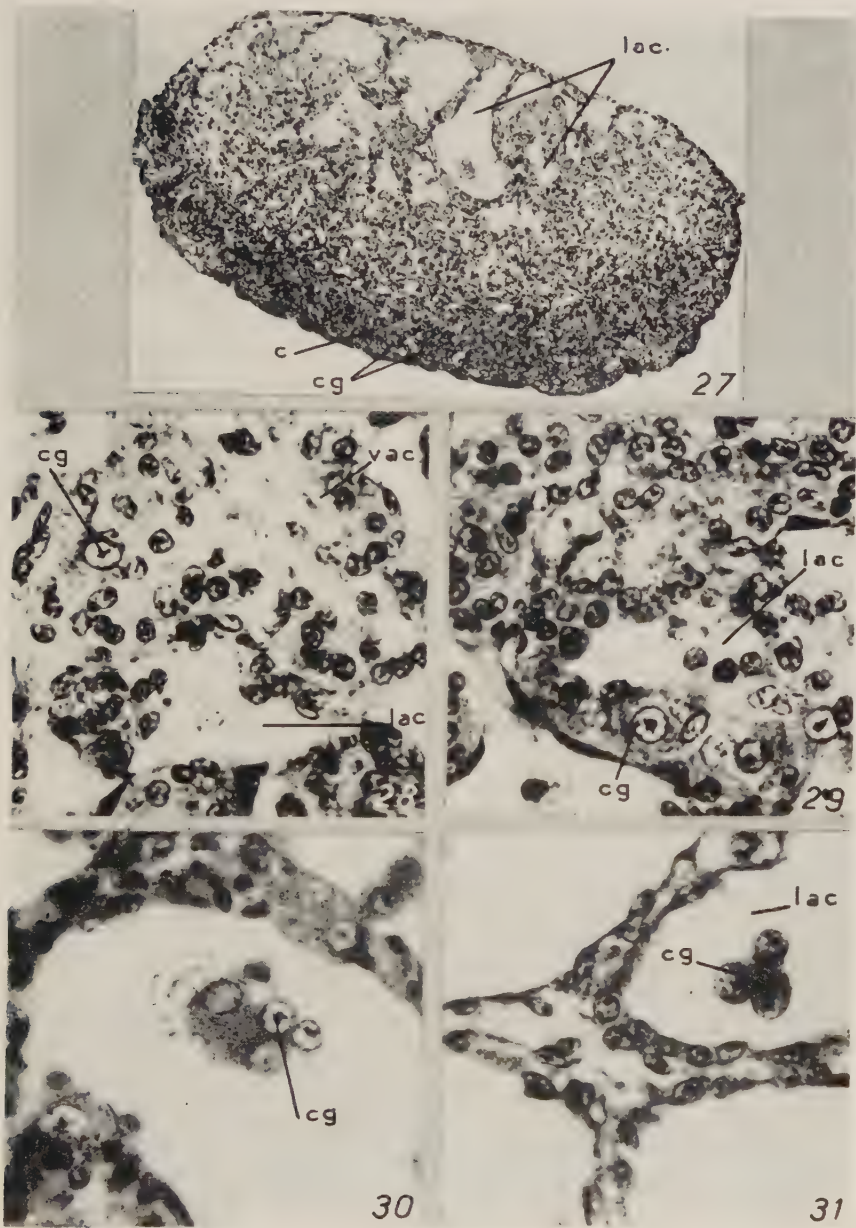


PLANCHE XVI

Action de substances tératogènes variées sur la glande génitale cultivée in vitro.

Fig. 32. — Testicule cultivé en présence de trypaflavine. Prélèvement au stade de 10 jours. Durée de la culture : 4 jours. Désorganisation de la structure testiculaire de l'explant. Sous l'épithélium (*ep*), réseau de lacunes (*lac*) rappelant la structure d'une gonade droite femelle (Gr. $\times 112,5$).

Fig. 33. — Ovaire cultivé en présence de colchicine (conc. $5,5 \times 10^{-5}$ mg). Stade du prélèvement : 10 jours. Culture : 4 jours. La division de nombreux noyaux est bloquée au stade métaphase (*nm*). Décortication très nette de l'ovaire. *cg*, cellules germinales (Gr. $\times 120$).

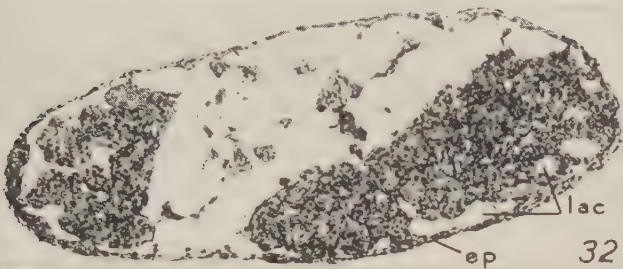
Fig. 34. — Détail de la figure précédente (fig. 33). Des amas de gonocytes se détachent de l'ovaire (Gr. $\times 510$).

Fig. 35. — Détail d'un ovaire traité par la narcotine (conc. par milieu : 56 γ). La zone corticale est inhibée; la médullaire renferme de nombreux noyaux dont les divisions ont été bloquées (*nm*) par la substance toxique (Gr. $\times 420$).

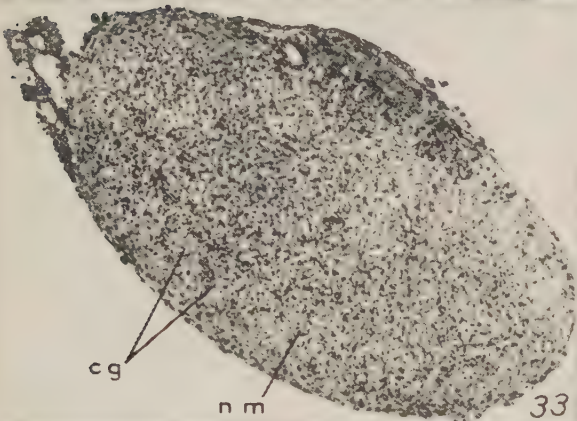
Fig. 36. — Aspect d'ensemble de l'ovaire. Coupe transversale. De petits tubes testiculaires (*tt*) occupent la médullaire. Le cortex est absent (Gr. $\times 97,5$).

Fig. 37. — Détail de la zone médullaire et corticale d'un ovaire traité par le cacodylate de sodium (100 γ par milieu). La zone correspondant au cortex est très réduite. Les tissus sont sains. *c*, rudiment cortical; *md*, médullaire (Gr. $\times 367$).

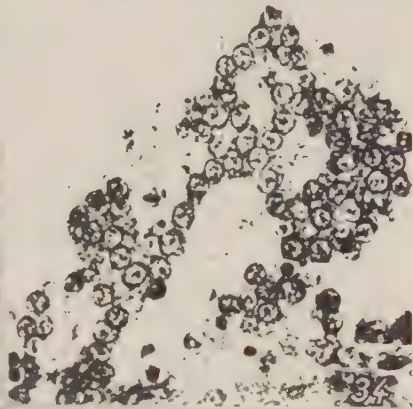
Fig. 38. — Ovaire prélevé à 10 jours et cultivé en présence de cacodylate de sodium (133 γ par milieu) pendant 6 jours. Vue d'ensemble. Absence d'un cortex. La médullaire (*md*) est occupée par de petits tubes testiculaires (*tt*) (Gr. $\times 82,5$).



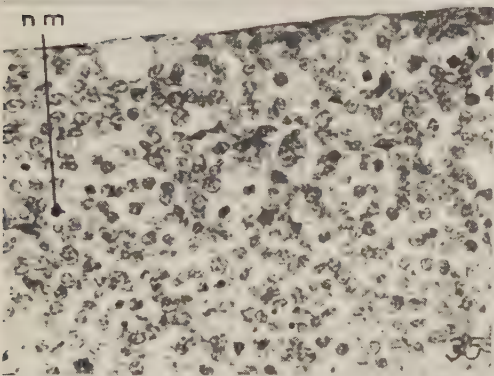
32



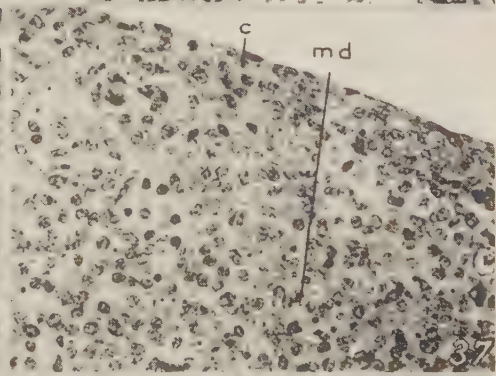
33



34



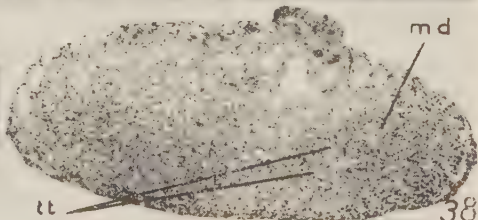
35



37



36



38

PLANCHE XVII

PLANCHE XVII

*Evolution des gonades cultivées in vitro en présence d'hydroquinone,
de nicotine et d'une atmosphère pauvre en oxygène.*

- Fig. 39. — Ovaire de poulet prélevé au stade de 10 jours et soumis pendant 4 jours à l'action de l'hydroquinone (conc. 6,11 γ). Détail de cet ovaire. On ne distingue pas de zone corticale. La gonade est réduite à son seul constituant médullaire (Gr. $\times$ 350).
- Fig. 40. — Détail d'un ovaire traité par l'hydroquinone (conc. 4,9 γ). Les tissus sont sains. La zone corticale (*c*) est peu distincte de la médullaire (*md*). On observe du côté gauche une légère décortication (Gr. $\times$ 428).
- Fig. 41. — Détail d'un ovaire cultivé en présence de nicotine (conc. 93 γ). Région corticale. Nids à ovocytes renfermant de nombreuses vacuoles (*vac*) et des ovocytes isolés (*cg*) (Gr. $\times$ 900).
- Fig. 42. — Aspect d'un testicule soumis à l'action de la nicotine (conc. 93 γ). Prélèvement : stade de 10 jours. Durée de la culture : 4 jours. La structure testiculaire est inhibée. Dans les espaces vides, on observe des noyaux isolés sains. *vac*, vacuoles; *cg*, cellules germinales (Gr. $\times$ 338).
- Fig. 43. — Ovaire explanté à l'âge de 10 jours, soumis à l'atmosphère d'azote pendant 48 heures. Durée de la culture : 4 jours. Le cortex sain renferme de nombreux gonocytes. Dans la médullaire (*md*), on aperçoit des noyaux en pycnose (*np*). *lac*, lacunes (Gr. $\times$ 325).
- Fig. 44. — Coupe transversale d'un ovaire ayant séjourné pendant 48 heures en atmosphère d'azote. Détail du cortex qui se trouve au contact de la médullaire pycnotique. Dans ce cortex sain, on observe des figures mitotiques (Gr. $\times$ 325).
- Fig. 45. — Ovaire prélevé au stade de 10 jours, soumis pendant 48 heures à l'atmosphère d'azote. Durée de la culture : 6 jours. Présence de gonocytes dans le cortex (*c*). L'épithélium germinatif (*cg*) est aberrant. De nombreuses vacuoles (*vac*) et des lacunes occupent la médullaire (*md*). Peu de noyaux pycnotiques (Gr. $\times$ 325).
-

